

INSTYTUT MEDYCyny DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
IM. M. MOSSAKOWSKIEGO PAN
ZAKŁAD NEUROBIOLOGII NAPRAWCZEJ

Luiza Stanaszek

**Regulacja procesu endogennej neurogenezy
po ischemii mózgu: udział metaloproteinaz
w przekazywaniu sygnałów z macierzy
zwnętrzkomórkowej**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
dr hab. n. med. Teresy Zalewskiej

Warszawa 2012



Projekt okładki i formatowanie: www.lovebird-design.com
Druk: EIKON PLUS ul. Wybickiego 46 31-302 Kraków





Podziękowania

Chciałabym serdecznie podziękować mojej promotorce,
dr hab. Teresie Zalewskiej
za nieocenioną pomoc merytoryczną, jak również inspirujące dyskusje, które dały mi
możliwość rozwoju zawodowego.

Z całego serca dziękuję
Małgorzacie Nałęcz, Patrycji Szymczak oraz **Joannie Sypeckiej**
za pomoc w realizacji projektu i okazaną przyjaźń.

Za pomoc techniczną dziękuję
Pani Elżbiecie Wanackiej, Pani Hannie Winiarskiej oraz **Pani Halinie Zajac**.

Serdecznie dziękuję
Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Zakładu Neurobiologii Naprawczej
za stworzenie wyjątkowo miłej atmosfery w pracy.

Chciałabym także podziękować mojej rodzinie,
mojemu Mężowi, Mamie i Tacie
za to, że we wszystkich trudnych chwilach byli przy mnie, wspierali mnie,
okazywali cierpliwość i we mnie wierzyli.





Prace zawierające wyniki opisane w rozprawie:

L. Wojcik, A. Sawicka, S. Rivera, T. Zalewska. Neurogenesis in gerbil hippocampus following brain ischemia: focus on the involvement of metalloproteinases. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 2009, 69 (1): 52-61.

L. Wojcik-Stanaszek, J. Sypecka, P. Szymczak, M. Ziemka-Nalecz, M. Khrestchatisky, S. Rivera, T. Zalewska. The potential role of metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global forebrain ischemia. *PLoS.One* 2011 6(7).



Spis treści

SKRÓTY UŻYWANE W PRACY	7
STRESZCZENIE	10
ABSTRACT	14
1. WSTĘP.....	17
1. 1. Wprowadzenie.....	17
1. 2. Krótka historia badań nad neurogenezą wieku dorosłego.....	17
1. 3. Neurogenеза w mózgu dorosłych ssaków.....	18
1. 3. 1. Nisze neuralnych komórek macierzystych w mózgu dorosłych ssaków.....	18
1. 3. 2. Neurogenеза w strefie okołokomorowej komór bocznych (SVZ).....	19
1. 3. 3. Neurogenеза w warstwie podziarnistej (SGZ) zakrętu zębatego hipokampa	20
1. 4. Regulacja neurogenезы wieku dorosłego.....	22
1. 5. Funkcjonalne znaczenie neurogenезы wieku dorosłego w warunkach fizjologicznych.....	23
1. 6. Neurogenеза w patologii ośrodkowego układu nerwowego. Wpływ niedokrwienia mózgu	24
1. 7. Macierz zewnątrzkomórkowa	26
1. 7. 1. Rola macierzy zewnątrzkomórkowej w neurogenезie.....	28
1. 8. Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs)	28
1. 8. 1. Charakterystyka ogólna metaloproteinaz	28
1. 8. 2. Struktura molekularna metaloproteinaz	30
1. 8. 3. Mechanizmy regulacji metaloproteinaz	31
1. 8. 4. Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej w fizjologii i patologii OUN.....	33
1. 9. Integryny i wewnątrzkomórkowe szlaki przekaźnictwa sygnałów z macierzy zewnątrzkomórkowej	36
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	39
3. MATERIAŁY I METODY.....	40
3. 1. Materiał doświadczalny	40
3. 2. Badania <i>in vivo</i>	40
3. 2. 1. Model całkowitego niedokrwienia mózgu	40
3. 2. 2. Analiza wbudowania 5-bromo-2-deoksyurydyny (BrdU)	41
3. 2. 3. Pobranie materiału do badań	41
3. 2. 4. Analiza immunohistochemiczna.....	42
3. 2. 5. Oznaczenie aktywności metaloproteinaz (MMP-2 i MMP-9) metodą zymografii <i>in situ</i>	44
3. 2. 6. Analiza ekspresji białka metodą Western blot	44
3. 3. Badania <i>in vitro</i>	46
3. 3. 1. Hodowla komórek linii HUCB-NSC.....	46
3. 3. 2. Dynamika wzrostu liczby komórek HUCB-NSC w hodowli.....	48
3. 3. 3. Analiza immunocytochemiczna	49
3. 3. 4. Analiza różnicowania HUCB-NSCs.....	49
3. 4. Wizualizacja mikroskopowa	49



3. 5. Analiza statystyczna.....	50
4. WYNIKI	51
4. 1. Dynamika proliferacji komórek w hipokampie dorosłego myszokoczka mongolskiego po całkowitym niedokrwieniu przodomózgowia	51
4. 2. Fenotypowa charakterystyka komórek proliferujących w hipokampie dorosłego myszokoczka mongolskiego.....	55
4. 3. Wpływ niedokrwienia na aktywność metaloproteinaz - 2 i -9 w hipokampie dorosłego myszokoczka mongolskiego.....	55
4. 4. Wpływ inhibitorów MMP - SB-3CT, GM6001 i doksycykliny na rozwój komórek linii HUCB-NSC.....	61
4. 5. Wpływ niedokrwienia na ekspresję i fosforylację/aktywację kinaz: FAK, PYK2, Src, ERK, JNK oraz Akt w hipokampie myszokoczka mongolskiego.....	65
4. 6. Ekspresja i fosforylacja kinaz: FAK, PYK2, Src, ERK, JNK, oraz Akt w komórkach linii HUCB-NSC. Wpływ inhibitora metaloproteinaz – SB-3CT	72
5. DYSKUSJA	78
6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....	89
7. WNIOSKI	90



SKRÓTY UŻYWANE W PRACY

AD	- choroba Alzheimera (<i>ang. Alzheimer Disease</i>)
ADAM	- adamalizyny – białka należące do klasy metaloproteinaz (<i>ang. A Disintegrin and Metalloproteinases</i>)
ANOVA	- analiza wariancji (<i>ang. analysis of variance</i>)
Akt	- kinaza serynowo-treoninowa (<i>ang. serine-threonine kinase</i>)
BDNF	- neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (<i>ang. Brain Derived Neurotrophic Factor</i>)
bFGF	- zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, inaczej FGF2 (<i>ang. Basic Fibroblast Growth Factor</i>)
BMP	- morfogenetyczne białko kości (<i>ang. Bone Morphogenic Protein</i>)
BrdU	- BromodeoksyUrydyna (<i>ang. BromodeoxyUridine</i>)
BSA	- albumina surowicy bydłowej (<i>ang. bovine serum albumine</i>)
CA	- Róg Ammona (<i>Cornu Ammonis</i>)
CAM	- cząsteczki adhezji komórkowej (<i>ang. Cell Adhesion Molecules</i>)
CSF	- płyn mózgowo-rdzeniowy (<i>ang. cerebrospinal fluid</i>)
DCX	- białko związane z mikrotubulami, charakterystyczne dla migrujących neuronów (<i>ang. doublecortin</i>)
DG	- zakręt zębaty (<i>ang. Dentate Gyrus</i>)
EAE	- eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu (<i>ang. Experimental Allergic Encephalomyelitis</i>)
ECM	- macierz zewnątrzkomórkowa (<i>ang. extracellular matrix</i>)
EGF	- naskórkowy czynnik wzrostu (<i>ang. epithelial growth factor</i>)
EMMPIRIN	- czynnik indukcji metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (<i>ang. Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer</i>)
ERK	- kinaza białkowa regulowana czynnikami zewnętrznymi (<i>ang. Extracellular signal-Regulated Kinase</i>)
FAK	- kinaza białkowa (<i>ang. Focal Adhesion Kinase</i>)
FBS	- bydłowa surowica płodowa (<i>ang. Fetal Bovine Serum</i>)
FGF	- czynnik wzrostu fibroblastów inaczej (<i>ang. Fibroblast Growth Factor</i>)
FITC	- izotiocyjanian fluoresceiny (<i>ang. fluorescein isothiocyanate</i>)
GABA	- kwas γ -aminomasłowy
GALC	- galaktozyloceramidaza, antygen oligodendrocytów (<i>ang. galactosylceramidase</i>)

GFAP	- glejowe kwaśne białko włókienkowe (<i>ang. Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
GZ	- warstwa ziarnista (<i>ang. granular zone</i>)
HUCB-NSC	- linia ludzkich neuralnych komórek macierzystych wyprowadzona z krwi pępowinowej (<i>ang. Human Umbilical Cord Blood derived Neural Stem Cell</i>)
IGF-1	- insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (<i>ang. Insulin-like Growth Factor-1</i>)
IL	- interleukina
JNK	- kinaza N-końca białka c-Jun (<i>ang. c-Jun N-terminal kinase</i>)
Ki67	- białko obecne w jądrach komórek mitotycznych
LIMP	- duży inhibitor metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (<i>ang. Large Inhibitor of Matrix Metalloproteinases</i>)
MAP2	- białko stabilizujące mikrotubule, (<i>ang. Microtubule Associated Protein 2</i>)
MAPK	- kinaza aktywowana mitogenami (<i>ang. Mitogen Activated Protein Kinase</i>)
MMP	- metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (<i>ang. matrix metalloproteinases</i>)
MT-MMP	- metaloproteinazy błonowe (<i>ang. Membrane Type Matrix Metalloproteinases</i>)
N-CAM	- neuralne cząsteczki adhezji komórkowej (<i>ang. Neural Cell Adhesion Molecules</i>)
NeuN	- białko jądrowe specyficzne dla dojrzałych neuronów (<i>ang. Neuronal Nuclei Antigen</i>)
NF200	- neurofilament tzw. ciężki o masie molekularnej 200kDa (<i>ang. 200 kDa Neurofilament protein</i>)
NMDA	- kwas N-metylo-D-asparaginowy (<i>ang. N-methyl-D-aspartic acid</i>)
NSC	- neuralne komórki macierzyste (<i>ang. Neural Stem Cell</i>)
NSE	- enolaza neuronowa (<i>ang. Neuronal Specific Enolase</i>)
OB	- opuszka węchowa (<i>ang. Olfactory Bulb</i>)
OEC	- komórki nabłonka węchowego (<i>ang. Olfactory Ensheathing Cells</i>)
OUN	- Ośrodkowy Układ Nerwowy
PBS	- roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym (<i>ang. Phosphate Buffered Saline</i>)
PFA	- paraformaldehyd (<i>ang. ParaFormAldehyde</i>)
PMSF	- fluorek fenylmetylosulfonylowy (<i>ang. phenylmethylsulfonyl</i>)

	<i>fluoride)</i>
PNN	- sieci perineuronalne (<i>ang. perineuronal nets</i>)
PYK2	- bogata w prolinę kinaza tyrozynowa 2 (<i>ang. Proline-rich tyrosine (Y) Kinase 2</i>)
RMS	- donosowy strumień migracji (<i>ang. Rostral Migratory Stream</i>)
s.o.	- warstwa początkowa (<i>stratum oriens</i>)
s.r.	- warstwa promienista (<i>stratum radiatum</i>)
S100β	- antygen dojrzałych astrocytów (<i>ang. S100 calcium-binding protein B</i>)
SDS	- siarczan dodecylanu sodu (<i>ang. sodium dodecyl sulfate</i>)
SGZ	- warstwa podziarnista (<i>ang. subgranular zone</i>)
SM	- stwardnienie rozsiane (<i>Sclerosis Multiple</i>)
SVZ	- strefa okołokomorowa (<i>ang. subventricular zone</i>)
TGFα lub β	- transformujący czynnik wzrostu (<i>ang. Transforming Growth Factor α or β</i>)
TIMP	- tkankowy inhibitor metaloproteinaz (<i>ang. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i>)
TNF	- czynnik martwicy nowotworu (<i>ang. Tumor Necrosis Factor</i>)
tPA	- tkankowy aktywator plazminogenu (<i>ang. tissue Plasminogen Activator</i>)
TUJ1	- neuronalne białko neurofilamentowe, marker neuronów
uPA	- urokinazowy aktywator plazminogenu (<i>ang. urokinase Plasminogen Activator</i>)
VEGF	- czynnik wzrostu śródbłónka naczyń (<i>ang. Vascular Endothelial Growth Factor</i>)

STRESZCZENIE

Wyniki badań eksperymentalnych ostatnich dwudziestu lat wskazują na aktywację procesów neurogenezy w niektórych stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego. Podwyższoną aktywność proliferacyjną komórek macierzystych/progenitorowych w strefach neurogennych mózgu - w warstwie komórek podziarnistych (SGZ) zakrętu zębatego oraz w okolicy komór bocznych (SVZ), ich migrację do uszkodzonych struktur mózgowia i różnicowanie do odpowiednich fenotypów zaobserwowano w różnych modelach niedokrwienia. Można zatem przypuszczać, że w niektórych sytuacjach środowisko dojrzałego mózgu prezentuje permisywny charakter indukując aktywację neurogenezy. Mechanizmy molekularne odpowiedzialne za pobudzenie endogennych komórek macierzystych/progenitorowych nie zostały jak dotąd w pełni zdefiniowane. Intensywne badania procesów neurogenezy w czasie rozwoju embrionalnego wskazują, że podstawowym mechanizmem sterującym procesami proliferacji, migracji i różnicowania komórek progenitorowych są czynniki otaczającego środowiska, w którym kluczową rolę wydają się pełnić białka macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. extracellular matrix) i ich receptory. Przejście komórki macierzystej na kolejne etapy rozwoju zależy prawdopodobnie od zmiany struktury ECM, głównie na drodze proteolizy jej elementów białkowych. Za proteolityczne przemodelowanie macierzy zewnątrzkomórkowej w ośrodkowym układzie nerwowym odpowiadają głównie dwie metaloproteinazy należące do grupy żelatynaz – metaloproteinaza 2 (MMP-2) i metaloproteinaza 9 (MMP-9). Aktywacja tych enzymów prowadzi do zmian oddziaływania pomiędzy komórkami a białkami macierzy. Zgodnie z takim założeniem, ścisła interakcja komórka-ECM mogłaby promować proliferację, natomiast osłabienie czy inhibicja wzajemnych oddziaływań byłaby sygnałem inicjującym migrację nowych komórek do miejsc przeznaczenia. Konsekwencją tego procesu jest zmiana stopnia interakcji na linii komórka-ECM, modulacja wewnątrzkomórkowego szlaku przekaźnictwa sygnałów i w końcu podjęcie decyzji o przejściu komórki macierzystej na kolejne etapy rozwoju. Zagadnienie roli sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej w procesach neurogenezy w dojrzałym mózgu nie było dotychczas przedmiotem badań. Natomiast wyjaśnienie tego problemu może umożliwić poznanie jednego z narzędzi kontroli nad ekspansją *in situ*, co w perspektywie czasu może przyspieszyć wprowadzenie terapii regeneracyjnej przez stymulację naturalnej repopulacji uszkodzonych komórek.

Celem prezentowanej rozprawy było określenie udziału przekaźnictwa sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej w procesach neurogenezy endogennej po niedokrwieniu przodomózgowia dorosłych myszokoczków mongolskich.

Badania prowadzono na modelu krótkotrwałego (5 minut) całkowitego niedokrwienia przodomózgowia myszokoczek mongolskiego, które indukuje wybiórcze uszkodzenie neuronów piramidowych rejonu CA1 hipokampa, przy zachowaniu niezmięnionej struktury

zakrętu zębatego. W toku realizacji celu pracy określono *ex vivo* stopień neurogenezy w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w różnym czasie reperfuzji po niedokrwieniu oraz aktywność metaloproteinaz – metaloproteinazy 2 i metaloproteinazy 9. Zbadano także wpływ inhibitorów metaloproteinaz na proliferację i różnicowanie komórek linii HUCB-NSC. Ostatni etap pracy obejmował określenie ekspresji i aktywności kinaz (FAK, PYK2, Src, ERK, JNK, Akt) uczestniczących w przekaźnictwie sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej. Oznaczenia te wykonano zarówno w układzie *ex vivo* w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego jak i w komórkach linii HUCB-NSC.

Badania *ex vivo* prowadzono na dwóch fragmentach hipokampa, różniących się odpowiedzią na epizod niedokrwienno – fragmencie grzbietowym (ze strukturą CA1) i brzuszny (z zakrętem zębatym).

Proliferację komórek określano stopniem wbudowania 5-bromo-2-deoksyurydyny (BrdU) do DNA podczas jego replikacji w fazie S cyklu komórkowego. Fenotyp komórek identyfikowano immunohistochemicznie przy zastosowaniu specyficznych przeciwciał. Aktywność metaloproteinaz oznaczano metodą zymografii *in situ*. Dla oznaczenia aktywności i ekspresji kinaz komórkowych zastosowano metodę Western blot.

Otrzymane wyniki wskazują na znaczącą stymulację proliferacji progenitorów neuralnych w SGZ zakrętu zębatego. Po upływie 2-4 tygodni od momentu niedokrwienia nowe komórki (wyznakowane BrdU) przemieszczają się do warstwy komórek ziarnistych i przekształcają w dojrzałe neurony. W przeciwieństwie do znaczącej stymulacji endogennej neurogenezy w zakręcie zębatym, w uszkodzonej w wyniku niedokrwienia warstwie piramidowej CA1 liczba komórek wbudowujących BrdU była niewiele wyższa w porównaniu z kontrolą. W pewnej ich liczbie obecne było nawet białko NF-200, pojawiające się na wczesnym etapie rozwoju neuronu. Niestety, komórki te nie przekształcały się w neurony dojrzałe, ulegając prawdopodobnie programowanej śmierci poprzedzającej ich dalszy rozwój. W toku prowadzonych badań nie znaleziono także, oczekiwanego przez autorkę pracy, dowodu przemieszczenia komórek progenitorowych z neurogennej strefy SGZ do uszkodzonej w wyniku niedokrwienia warstwy neuronów piramidowych. Zatem spodziewana zdolność kompensacji utraconych neuronów przez endogenne progenitory w opisanych warunkach eksperymentalnych wydaje się być iluzją.

Jedną z bardziej interesujących obserwacji jest wyraźna różnica poziomu aktywności metaloproteinaz w badanych strukturach hipokampa. Stymulacji rozwoju neuralnych komórek macierzystych w zakręcie zębatym po niedokrwieniu przodomózgowia towarzyszy wyraźny wzrost aktywności MMPs. Taki czasowo-przestrzenny związek pomiędzy aktywacją metaloproteinaz a przyspieszoną proliferacją komórek macierzystych/progenitorowych i ich późniejszym różnicowaniem do dojrzałych neuronów może sugerować istnienie przyczynowego związku pomiędzy tymi procesami. Za słusznością tej sugestii przemawiają wyniki eksperymentów wykonanych na hodowli komórek linii HUCB-NSC w obecności inhibitora metaloproteinaz – SB-3CT. Obecność inhibitora redukowała stopień proliferacji komórek oraz ich różnicowania w kierunku neuronów. W tym samym eksperymencie

notowano, w porównaniu z kontrolą, wzrost liczby oligodendrocytów i astrocytów, wynikający prawdopodobnie ze wzrostu proliferacji. O roli MMPs świadczy również brak wpływu na proces neurogenezy inhibitorów proteinaz serynowych i furyny.

Zmiany aktywności badanych metaloproteinaz we fragmencie grzbietowym przebiegają według innego wzorca. Podczas gdy aktywność proteolityczna tych enzymów spada poniżej poziomu kontroli w warstwie uszkodzonych neuronów piramidowych, w *stratum oriens* i *stratum radiatum* notuje się wyraźny wzrost aktywności.

Logicznym ciągiem prowadzonych badań było sprawdzenie, czy i w jaki sposób opisane wyżej różnice aktywności metaloproteinaz modulują wewnątrzkomórkowy szlak przekazywania z ECM. W tym celu określono aktywność/fosforylację dwóch kinaz tyrozynowych: kinazy FAK i kinazy PYK2, będących pierwszymi odbiorcami sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej, oraz ich potencjalnych substratów – kinazy Src, ERK, JNK i Akt. Wyniki uzyskane w toku badań wskazują na spadek fosforylacji kinazy FAK wyłącznie w zakręcie zębatym. Odpowiedź kinazy koreluje ze wzrostem aktywności metaloproteinaz. Można założyć, że obniżenie fosforylacji enzymu zmniejsza stopień adhezji do macierzy zewnątrzkomórkowej i ułatwia migrację komórek do strefy ziarnistej DG. Obniżenie fosforylacji kinazy PYK2 we fragmencie grzbietowym hipokampa przy zachowaniu stałego poziomu kinazy FAK wskazuje, że obie kinazy mają odmienne własności funkcjonalne pomimo wysokiej homologii. Konsekwencją obniżenia aktywności obu kinaz jest redukcja fosforylacji kinazy ERK, końcowego substratu obu enzymów. Na podstawie braku specyficzności odpowiedzi kinazy ERK trudno stwierdzić jej zaangażowanie w neurogenezę poniedokrwienną.

Pomimo istniejących danych wskazujących na udział w regulacji proliferacji PI3/Akt i przeżycia neuralnych komórek macierzystych/progenitorowych w mózgu dojrzałym, nie odbiegający od kontroli poziom aktywacji/fosforylacji kinazy Akt jak i JNK stawia pod znakiem zapytania udział tych enzymów jako czynników krytycznych odpowiedzialnych za stymulację neurogenezy poniedokrwienną w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego. Należy jednak mieć na uwadze fakt, że strefa neurogenna zakrętu zębatego stanowi jedynie niewielką część objętości badanego fragmentu brzuszno-hipokampa a heterogenne populacje komórek tej struktury mogą dawać niejednoznaczne odpowiedzi w warunkach eksperymentu.

Opisane badania *ex vivo* nad udziałem kinaz białkowych zostały powtórzone w modelu eksperymentalnym *in vitro* z zastosowaniem hodowli linii komórek HUCB-NSC. Odnotowany znaczący wzrost ufosforylowania kinazy FAK oraz ekspresji białka kinazy w czasie intensywnej proliferacji i różnicowania komórek HUCB-NSC może wskazywać na zaangażowanie enzymu w proces neurogenezy w tym układzie doświadczalnym. Obniżenie poziomu fosforylacji w komórkach traktowanych inhibitorem metaloproteinaz – SB-3CT koreluje z redukcją dynamiki podziałów komórkowych. Obecna w komórkach HUCB-NSC kinaza PYK2 prezentuje stały poziom przez cały czas prowadzonego eksperymentu i nie wydaje się pełnić roli w dojrzewaniu komórek HUCB-NSC. Podobnie kinazy MAP (ERK i JNK) oraz kinaza Akt od początku do końca eksperymentu (4-14 dni) pozostawały aktywne, prezentując stały

poziom fosforylacji i nie ulegały modulacji w warunkach wzrostu aktywności kinazy FAK. Na tle podwyższonej aktywności katalitycznej i ekspresji białka FAK zaskakuje brak zmian aktywności jej substratów, które w tym układzie nie wydają się być związane z przekazem sygnału na ścieżce ECM–integryna–FAK. Dowodem pośrednim może być także brak wpływu inhibitora metaloproteinaz.

Na podstawie tych danych nie jest możliwe wyjaśnienie roli aktywacji kinazy FAK w czasie proliferacji i różnicowania. Związanie liganda zewnątrzkomórkowego przez receptor integrynowy i aktywacja kinazy umożliwi przyłączenie około 50 białek sygnałowych i strukturalnych, które potencjalnie mogą być włączone w neurogenezę. Dodatkową trudność w określeniu roli kinazy kontaktów adhezyjnych stanowi fakt, że pośredniczy ona w dwukierunkowym przenoszeniu sygnału. Podczas gdy sygnały z zewnątrz kierują zmianą organizacji cytoszkieletu i jądrową ekspresją genów, białka sygnałowe przenoszące sygnał z wnętrza komórki wpływają na budowę ECM oraz na zachowanie sąsiednich komórek i tkanek. Nie wiemy czy i który kierunek przekazu sygnału jest uprzywilejowany w określonych warunkach doświadczalnych.

Uzyskane wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

- Całkowite niedokrwienie mózgu myszokoczka mongolskiego stymuluje neurogenezę w strefie podziarnistej (SGZ) zakrętu zębatego hipokampa.
- Czasowo-przestrzenna korelacja procesu neurogenезy i aktywności metaloproteinaz w zakręcie zębatym wskazuje na zaangażowanie tych enzymów w rozwój komórek macierzystych/progenitorowych.
- Poniedokrwienna stymulacja neurogenезy endogennej nie zapewnia repopulacji uszkodzonych komórek nerwowych sektora CA1 hipokampa.
- Aktywność metaloproteinaz w strukturach CA1 - *stratum oriens i radiatum* może być związana z procesami przemodelowania tkanki.
- Na podstawie uzyskanych wyników nie można jednoznacznie określić udziału badanych kinaz białkowych - przekaźników sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej, w neurogenезie poniedokrwiennej w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego.

ABSTRACT

Many recent studies have noted that ischemia resembles other brain injuries in producing enhanced neurogenesis in neuroproliferative regions of the adult rodent brain, including the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles and the subgranular zone (SGZ) of dentate gyrus of the hippocampus. The discovery of neurogenic responses subsequent to ischemic injury has led to the hypothesis that the expansion of the pool of endogenous progenitors could augment the regenerative capacity of the damaged areas. Therefore, the identification of mechanisms that promote the proliferation of progenitors, migration toward injured brain areas and differentiation into the phenotype of lost neuronal cells has become particularly relevant to the development of stem cell-based therapies. It is hypothesized that following ischemic insult, neurogenesis proceeds as it does during embryonic development, involving the concerted action of cell surface receptors and extracellular matrix molecules (ECM), thereby providing an environment which may be instructive or permissive to neurogenesis-associated processes. In this context, enzymes that modify the extracellular matrix and cell adhesion molecules are particularly interesting. The matrix metalloproteinases -2 and -9 (MMP-2, MMP-9) are one of such group of proteinases known to play important roles in the ECM remodelling required for developmental processes. Cleavage of matrix components by proteolysis affects the interaction between the ECM and intracellular signalling pathways that would determine further cell fate. Despite ever-growing information concerning the involvement of MMPs in neurogenesis-associated processes *in vitro* and *ex vivo* in experimental stroke models the proof of relevance *in vivo* after transient forebrain ischemia is still missing.

This prompted us to investigate the role of signalling from extracellular matrix in the endogenous neurogenesis after forebrain ischemia in the adult gerbil. We employed a well defined model of 5 min. ischemia in Mongolian gerbils, which leads to neuronal death restricted to the CA1 region of the hippocampus. Our attention was primarily focused on the temporal and spatial relationship between the proliferation of neural stem/progenitor cells and /or further differentiation with activity of metalloproteinases – MMP-2 and MMP-9. In an effort to further elucidate the involvement of MMPs in neurogenesis-associated processes, we have also tested the effect of MMPs inhibitors on the development of a neural stem cell line derived from human umbilical cord blood (HUCB-NSCs). The last stage of investigation comprised the evaluation of expression and activity of non-receptor tyrosine kinases (FAK, PYK2, Src, ERK, JNK, Akt) engaged in signal transduction from extracellular matrix.

The results showed that adult neuronal progenitors proliferate *in situ* in response to ischemia. At the prolonged time of reperfusion (14 and 28 days) numerous progenitor cells relocate into the granular cell layer and become mature granular neurons.

In contrast, in the damaged CA1 pyramidal layer only a small number of proliferating cells was observed. Moreover, they did not express mature neuronal antigen, suggesting they undergo programmed cell death before attaining maturity. There was also no evidence of SGZ

neural stem cells migration into the CA1 to replace neurons lost after ischemia. From the above it follows that in the present experimental conditions, the expected endogenous regenerative capacity fails as a source of meaningful compensation for lost neuronal circuits.

One of the most interesting findings obtained in the current work is that ischemia elicits contrasting effects on the spatial pattern of MMP activity that matches the progression of proliferation in the DG across time and correlates well with the process of differentiation of stem/progenitor cells into mature neurons. Such a spatio-temporal relationship between activation of MMPs and neurogenesis may suggest a casual link between these processes. This finds strong support in our cell culture experiments showing that inhibition of endogenous activity in the presence of SB-3CT significantly reduced both their proliferation and their differentiation toward the neuronal lineage. Simultaneously the number of oligodendrocytes and astrocytes augmented compared to the control, probably due to increased proliferation. These data support our *in vivo* results relative to the involvement of MMPs in the development of progenitors. Further support to stress the importance of MMPs in neurogenesis as compared with other proteinases stems from the failure of serine proteinase and furin inhibitors (Pefabloc and Dec-RVKR-CMK) to modulate this process.

In contrast, in the ischemia-damaged pyramidal cell layer the activity of MMPs dropped below the control levels during reperfusion. At comparable time points incipient activation of MMPs was found in adjacent brain areas – *stratum oriens* and *stratum radiatum*. In these regions increased MMPs activity may facilitate delayed tissue remodelling at the periphery of the lesion.

Focal adhesion kinase (FAK) and proline-rich calcium dependent kinase (PYK2) are thought to play a major role in transduction of extracellular matrix-derived signal into the cells. Therefore, the last purpose of the current work was to check if the MMPs activity differentially affects the FAK- and/or PYK2-coupled signalling in investigated hippocampal structures as well as in the HUCB-NSCs culture. However, the obtained results do not allow to confirm the participation of the FAK- or PYK2-dependent pathway in post-ischemic neurogenesis in gerbil hippocampus.

In conclusion:

- global ischemia of a gerbil brain stimulates neurogenesis in the subgranular zone of the dentate gyrus
- spatio-temporal correlation between the neurogenesis and metalloproteinases activity in the dentate gyrus indicates the involvement of these enzymes in the development of stem/progenitor cells
- enhancement of post-ischemic endogenous neurogenesis does not enable compensation for lost neuronal circuits
- activity of metalloproteinases in the CA1 regions – *stratum oriens* and *stratum radiatum* may facilitate tissue remodelling
- on the basis of the obtained results it is not possible to state whether investigated non-receptor



intracellular protein kinases – mediators of signal from ECM, participate in postischemic neurogenesis in gerbil hippocampus.



1. WSTĘP

1. 1. Wprowadzenie

„Gdy rozwój został zakończony, źródło wzrostu i regeneracji aksonów i dendrytów wyschło nieodwracalnie. W dorosłym układzie nerwowym ścieżki nerwowe są ustalone, zakończone i niezmiennie. Wszystko może zginąć, nic nie może się zregenerować. Zadaniem nauki w przyszłości będzie zmienić, o ile to możliwe, ten nieprzyjazny wyrok”.

Takie twierdzenie Santiago Ramón y Cajal, histolog i prekursor neurobiologii, zawarł w pracy opublikowanej w roku 1913 (Colucci-D'Amato i wsp. 2006; Ramon y Cajal 1913). Zgodnie z poglądem Cajala nowe komórki nerwowe tworzą się wyłącznie w okresie prenatalnym. Tkanka nerwowa jest „długotrwała”, zatem nie podlega procesom naprawy czy regeneracji w okresie postnatalnym. Wysoka specjalizacja funkcji mózgu ssaków miała być, według ówczesnych opinii, sprzeczna z tworzeniem nowych neuronów w mózgu osobników dojrzałych. Utrzymywano, że pojawienie się nowych komórek, ich różnicowanie do określonych fenotypów oraz prawdopodobna migracja, mogłyby zmienić istniejącą sieć neuronalną i prawdopodobnie niekorzystnie modulować precyzyjne mechanizmy regulujące funkcje mózgu.

Pogląd Cajala, uznawany za jeden z głównych dogmatów neurobiologii, przetrwał aż do lat 60-tych wieku XX. Jedną z przyczyn zahamowania rozwoju badań nad neurogenezą na tak długi okres, była nieznajomość odpowiednich technik badawczych i narzędzi. Dopiero prace Altmana (Altman 1962; Altman i Das 1967), Kaplana i Hindsa (Kaplan i Hinds 1977) oraz prace publikowane w latach 90-tych (Eriksson i wsp. 1998; Gage 1998) doprowadziły do odkrycia, iż neurogeneza ma miejsce, choć na znacznie niższym poziomie w stosunku do wieku embrionalnego, w mózgu osób dorosłych.

1. 2. Krótka historia badań nad neurogenezą wieku dorosłego

Odkrycie obecności komórek mitotycznych w ścianach komór bocznych mózgu cztero-miesięcznego szczura już w roku 1912 (Allen E. 1912) nie wpłynęło na zmianę opublikowanego rok później twierdzenia Cajala. Dopiero w latach 60-tych XX wieku, wraz z rozwojem autoradiografii, zaobserwowano dzielące się komórki w określonych obszarach mózgu dorosłych gryzoni (Altman 1962; Altman i Das 1967). Autor opisał także przemieszczanie się nowopowstałych komórek ze strefy okołokomorowej do opuszki węchowej (Altman 1969). Nieznajomość specyficznych markerów uniemożliwiła określenie fenotypu wyznakowanych radiograficznie komórek. Piętnaście lat później opisane badania zostały powielone przez Kaplana i Hindsa, którzy stosując doskonalszą technikę obrazowania, jaką była mikroskopia elektronowa, potwierdzili obecność komórek proliferujących w mózgu 3- miesięcznego szczura (Kaplan i Hinds 1977). Morfologia nowych komórek wskazywała na fenotyp neuronalny. Prace

te nie zostały w pełni zaakceptowane, ponieważ podstawą identyfikacji były wyłącznie kryteria morfologiczne.

Brak narzędzi badawczych, umożliwiających jednoznaczne określenie fenotypu nowopowstałych komórek, ponownie zablokował dalszy rozwój badań tej dziedziny biologii. Należy jednak odnotować sporadycznie pojawiające się publikacje wyników badań nad neurogenezą u gatunków nienależących do ssaków. Opisano regenerację siatkówki oka u złotej rybki oraz regenerację w obszarze kory mózgowia u jaszczurki (Hitchcock i wsp. 1992; Johns i Easter, Jr. 1977; Lopez-Garcia i wsp. 1992). Interesującym obiektem badań stały się również ptaki śpiewające, u których zaobserwowano powstawanie nowych neuronów w strefie okołokomorowej. Komórki te kierowane były głównie do jądra kontrolującego zdolność do śpiewu i integrowały się z istniejącą siecią neuronalną (Nottebohm 2002).

Wprowadzenie immuno- i cytochemicznych technik badawczych, umożliwiających identyfikację fenotypów nowych komórek, zainicjowało intensywny rozwój badań nad neurogenezą w mózgu dojrzałych osobników. Autorzy prac opublikowanych na początku lat dziewięćdziesiątych udowodnili, że wyizolowane z mózgu neuralne komórki macierzyste (NSC, Neural Stem Cells) mają zdolność tworzenia nowych neuronów i komórek glejowych (Reynolds i Weiss 1992; Richards i wsp. 1992). Zastosowanie 5-bromo-3-deoksyurydyny (BrdU), znacznika wbudowującego się do DNA dzielących się komórek, potwierdziło uzyskane wcześniej wyniki (Kuhn i wsp. 1996) wskazujące, że nowe neurony tworzą się w dwóch strukturach mózgu – w warstwie podziarnistej (SGZ, subgranular zone) zakrętu zębatego hipokampa i w strefie okołokomorowej komór bocznych (SVZ, subventricular zone) (Doetsch 2003; Gage 1998; Gross 2000).

1. 3. Neurogeneza w mózgu dorosłych ssaków

1. 3. 1. Nisze neuralnych komórek macierzystych w mózgu dorosłych ssaków

W okresie postnatalnym neuralne komórki macierzyste zasiedlają swoje naturalne nisze tkankowe. Te wyspecjalizowane miejsca tworzą specyficzne środowisko przestrzenne, odgrywające istotną rolę w stymulacji i regulacji aktywnej neurogenezy (Alvarez-Buylla i Lim 2004; Kiel i Morrison 2008; Li i Xie 2005; Ma i wsp. 2005). Struktura nisz neuralnych komórek macierzystych, w przeciwieństwie do nisz występujących w szpiku kostnym, jelicie, wątrobie czy skórze, nie została jeszcze do końca poznana. Przyjmuje się, że w mózgu dorosłych osobników nisze NSC tworzą komórki śródbłonna, komórki wyściółki, astrocyty, komórki mikrogleju, neuralne komórki macierzyste i dojrzałe neurony (Ihrie i Alvarez-Buylla 2008; Jordan i wsp. 2007). Rusztowanie niszy tworzą elementy macierzy zewnątrzkomórkowej, odpowiedzialne za aranżację poszczególnych składników niszy i prezentację czynników neurotroficznych.

Ważną rolę w funkcjonowaniu niszy pełnią astrocyty, wspomagające wszystkie procesy

związane z neurogenezą - od samoodnowy komórek po ich wbudowywanie w sieć neuronalną (Ma i wsp. 2005; Song i wsp. 2002a). Komórki wyściółki poprzez kontakt komórka-komórka mogą indukować samoodnowę komórek SVZ, utrzymując ich pulę na stałym poziomie (Ramirez-Castillejo i wsp. 2006). Dzięki ruchowi rzęsek wspomagają one również migrację szlakiem donosowym (RMS, Rostral Migratory Stream) (Sawamoto i wsp. 2006). Niezwykle istotnym składnikiem niszy są naczynia krwionośne kontaktujące się z jej elementami w miejscach, w których brak jest warstwy astrocytów. Oddziaływanie i relacje poszczególnych elementów niszy zapewniają odpowiedni poziom czynników odpowiedzialnych za prawidłową neurogenezę.

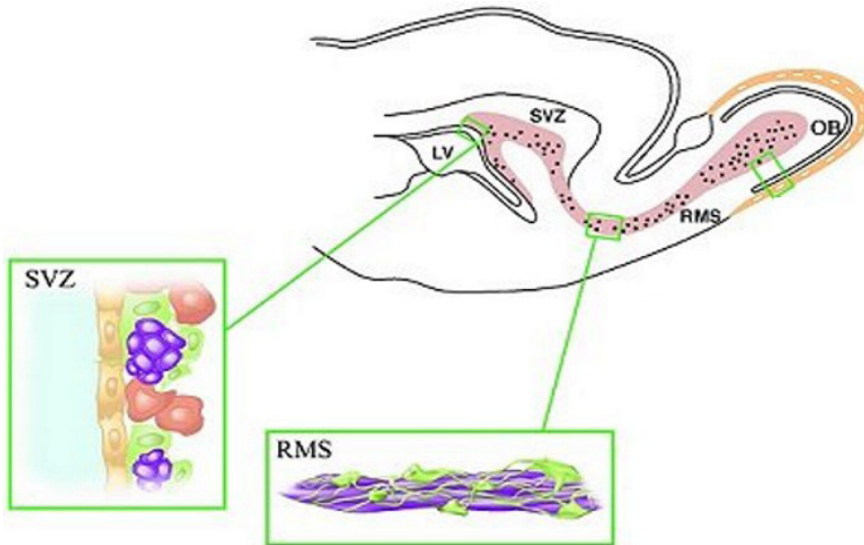
Endogenna neurogeneza jest procesem złożonym i wieloetapowym. Progenitory neuralne proliferują w strefie neurogennej, po czym migrują w kierunku miejsca przeznaczenia i różnicują się do fenotypu neuronalnego, a następnie dojrzewają tworząc funkcjonalne neurony (Balu i Lucki 2009).

Aktywny proces neurogenezy w mózgu dojrzałych ssaków ma miejsce w wymienionych wyżej strefach neurogennych. W obrębie struktur zwanych „nie-neurogennymi” (takich jak prążkowie, rejon CA1 hipokampa, ściana komór II i IV) stwierdzono również obecność neuralnych komórek macierzystych. Komórki te proliferują i różnicują się w komórki gleju. W warunkach patologicznych oraz *in vitro*, mogą jednak przekształcać się zarówno w neurony jak i komórki gleju (Arias-Carrion i wsp. 2007; Emsley i wsp. 2005; Lie i wsp. 2004).

1. 3. 2. Neurogeneza w strefie okołokomorowej komór bocznych (SVZ)

Strefa okołokomorowa komór bocznych dojrzałego mózgu zawiera największą liczbę mitotycznie aktywnych komórek. Obecność proliferujących komórek progenitorowych w obszarze okołokomorowym, a następnie ich migrację do opuszki węchowej poprzez donosowy szlak migracji RMS, odkryto najpierw u makaków a następnie u gryzoni i ludzi (Kam i wsp. 2009; Kornack i Rakic 2001). Na podstawie badań immunocytochemicznych i elektronomikroskopowych komórki SVZ zostały dokładnie scharakteryzowane. Są to wolno proliferujące neuralne komórki macierzyste o charakterze astrocytarnym, prezentujące białko GFAP (ang. Glial Fibrillary Acidic Protein) i Nestynę (komórki typu B). Komórki te przekształcają się w aktywnie dzielące się komórki typu C (Doetsch i wsp. 1999; Garcia i wsp. 2004), z których powstają neuroblasty (typ A). Komórki typu A zagęszczają się i w formie łańcuchów migrują szlakiem RMS do opuszki węchowej (OB, Olfactory Bulb) (Rycina 1) (Alvarez-Buylla i Garcia-Verdugo 2002; Doetsch 2003; Gage 2002). Dystans ten u gryzoni wynosi nawet kilkanaście milimetrów. Tunel tworzony przez wypustki astrocytów przyśpiesza migrację komórek, nadaje im kierunek i prawdopodobnie ułatwia ich przeżycie (Alvarez-Buylla i Garcia-Verdugo 2002). W opuszce węchowej neuroblasty różnicują się do dwóch typów interneuronów: komórek ziarnistych i komórek okołokłębuszkowych. Menn i wsp. utrzymują, że progenitory neuralne strefy okołokomorowej mogą różnicować się także w oligodendrocyty

(Menn i wsp. 2006). Cały proces trwa około 30 dni. Zgodnie z publikowanymi danymi około 50% nowopowstałych neuronów umiera po upływie 15-45 dni (Petreanu i Alvarez-Buylla 2002; Winner i wsp. 2002). Funkcja neuronów, które przeżyły nie jest dokładnie określona, choć rosnąca liczba dowodów sugeruje ich zaangażowanie w przetwarzanie informacji węchowych (Lledo i Gheusi 2003).



Rycina 1. Strefa okołokomorowa mózgu wraz z RMS i opuszką węchową (OB). Obrazek pobrany ze strony <http://www.cruirg.ulaval.ca/fr/recherche/axes/rechercheurs/armen-saghatelian.php>, zmodyfikowany.

1. 3. 3. Neurogeneza w warstwie podziarnistej (SGZ) zakrętu zębatego hipokampa

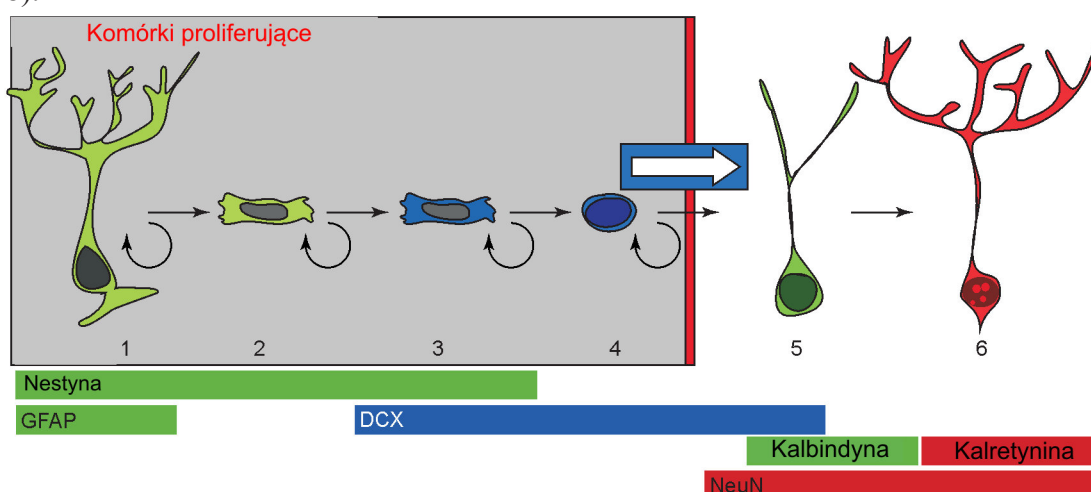
Strefa podziarnista (SGZ) znajduje się pomiędzy wnęką a warstwą komórek ziarnistych (GZ, granular zone). Jest to rejon o szerokości około 25 μm . Pierwsze hipokampalne komórki progenitorowe z dorosłego mózgu zostały wyizolowane przez Palmera w 1995 roku (Palmer i wsp. 1995; Palmer i wsp. 1999). Na podstawie morfologii i ekspresji charakteryzujących je markerów wyróżniono następujące typy komórek progenitorowych (Rycina 2):

- progenitory typu I (typ A) mają podobnie jak progenitory w SVZ charakter astrocytarny i zostały nazwane astrocytami promienistymi. Komórki te wykazują ekspresję białek GFAP oraz Nestyny. Ciało tych komórek ma kształt zbliżony do trójkąta oraz posiada długie promieniste wypustki sięgające do warstwy ziarnistej (Seri i wsp. 2001). Morfologia proliferujących komórek sugeruje podział asymetryczny, w wyniku którego powstaje kolejny typ progenitorów:
- progenitory typu II (typ D) powstają w wyniku proliferacji astrocytów promienistych. Małe, o nieregularnym kształcie progenitory typu II nie stanowią grupy jednorodnej. Tworzą one zwarte agregaty ulokowane pomiędzy wypustkami astrocytów promienistych. Komórki

te wykazują ekspresję Nestyny i/lub DCX (ang. doublecortin) i charakteryzują się wysokim potencjałem proliferacyjnym. Progenitory typu D migrują na małą odległość i różnicują się w neurony ziarniste (Seri i wsp. 2004).

Nowopowstałe neurony ziarniste wykazują ekspresję markerów dorosłych neuronów takich jak neurospecyficzna enolaza (NSE, neuronal specific enolase), kalbindyna, receptor NMDA i jądrowe białko NeuN (Kuhn i wsp. 1996). W ciągu kilku dni wytwarzają aksony i dendryty (van Praag i wsp. 2002). Po upływie 2-4 tygodni rozpoczyna się proces synaptogenezy. W okresie dwóch miesięcy od podziału nowe komórki wbudowują się do istniejącej sieci neuronalnej w większości jako dojrzałe neurony i wykazują właściwości elektrofizjologiczne. Zgodnie z opinią szeregu autorów (Imayoshi i wsp. 2008; Lagace i wsp. 2007; van Praag i wsp. 2002) w okresie postnatalnym komórki macierzyste zakrętu zębatego mogą różnicować się jedynie do jednego typu neuronów - neuronów ziarnistych pobudzających, podczas gdy w czasie rozwoju embrionalnego generują także interneurony GABA-ergiczne (Dupuy i Houser 1997).

Podobnie jak w przypadku neurogenezy w SVZ opisanej w poprzednim podrozdziale, większość nowo wygenerowanych neuronów po dwóch tygodniach wchodzi na drogę apoptozy (Biebl i wsp. 2000). Nie ma jednoznacznych opinii dotyczących możliwości powstawania astrocytów czy oligodendrocytów z komórek macierzystych zasiedlających SGZ (jednobiegowość neuralnych komórek macierzystych). Należy jednak podkreślić, że prekursorzy neuralne izolowane z hipokampa i hodowane w obecności czynnika wzrostu fibroblastów 2 (FGF-2, fibroblast growth factor-2) prezentowały zdolność do różnicowania we wszystkie trzy typy komórek: astrocyty, oligodendrocyty i neurony (Emsley i wsp. 2005; Gage 1998).



Rycina 2. Rycina opracowana przez Kempermana przedstawiająca etapy neurogenezy (Kempermann i wsp. 2004), zmodyfikowana.

1. 4. Regulacja neurogenezy wieku dorosłego

Neurogeneza wieku dorosłego, podobnie jak neurogeneza embrionalna, jest procesem dynamicznym. Neuralne komórki macierzyste odpowiadają na zmiany warunków fizjologicznych, na przykład starzenie i związane z tym procesem zmiany poziomu hormonów płciowych (Tanapat i wsp. 1999), bodźce zewnętrzne, ćwiczenia fizyczne czy wzbogacone środowisko (Abrous i wsp. 2005; Arias-Carrion i wsp. 2007; Kempermann i wsp. 1997; Kuhn i wsp. 1996). Czynniki te mogą modulować stopień proliferacji, migracji i różnicowania (Balu i Lucki 2009; Grote i Hannan 2007).

Dotychczas nie zostały wyjaśnione precyzyjne mechanizmy komórkowe i molekularne sterujące cyklem życiowym komórek macierzystych, a szczególnie istotnym z punktu widzenia praktycznego przejściem z fazy spoczynkowej do proliferującej oraz zachowaniem równowagi pomiędzy przeżyciem a eliminacją. Anatomiczne i histologiczne właściwości nisz neurogennych, obecność komórek śródbłonna (Shen i wsp. 2004), kapilarnych naczyń krwionośnych (Palmer i wsp. 2000), astrocytów (Ma i wsp. 2005; Song i wsp. 2002a) i komórek wyściółki (Lim i wsp. 2000) a przede wszystkim uwalniane przez nie czynniki mogą pełnić istotną rolę w kontroli NSCs. Wzajemne interakcje komórek nisz neurogennych jak i ich oddziaływanie z elementami macierzy zewnątrzkomórkowej mają także znaczący wpływ na zachowanie progenitorów w dojrzałym mózgu. Opisano na przykład, że obecne w niszach efryny i ich receptory regulują dynamikę proliferacji (Conover i wsp. 2000; Holmberg i wsp. 2005).

Liczną grupę molekuł pełniących kluczową rolę w regulacji proliferacji i różnicowania NSCs stanowią czynniki wzrostu i neurotrofiny, między innymi nabłonkowy czynnik wzrostu (EGF, epithelial growth factor) i czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF-2, inaczej bFGF, basic fibroblast growth factor), insulino-podobny czynnik wzrostu (IGF-1, insulin-like growth factor), czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF, brain derived neurotrophic factor). Interesujące jest spostrzeżenie, że tzw. „gorące miejsca proliferacji” są często zlokalizowane w sąsiedztwie naczyń krwionośnych, co sugeruje udział uwalnianego czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF, vascular endothelial growth factor) (Jin i wsp. 2002).

W regulację neurogenezy wieku dorosłego włączone są także białka morfogenetyczne kości (BMPS, bone morphogenic proteins), promujące powstawanie komórek glejowych *in vitro* i *in vivo* (Lim i wsp. 2000). W zakręcie zębatym kontrolną funkcję nad proliferacją neuroblastów i ich różnicowaniem w neurony pełnią białka Wnt, wydzielane przez astrocyty stref neurogennych w mózгах dorosłych osobników (Lie i wsp. 2005). Inhibicja Wnt znacząco obniża stopień neurogenezy w hipokampie.

W oparciu o wyniki prac eksperymentalnych postuluje się udział Notch i specyficznych receptorów Notch1 w proliferacji i wyborze kierunku różnicowania progenitorów neuralnych w SVZ i SGZ. Aktywacja tej drogi przekazywania sygnałów wydłuża także czas przeżycia komórek poprzez regulację mitogenu Sonic hedgehog (Shh) (Androutsellis-Theotokis i wsp. 2006; Breunig i wsp. 2007).

Badania ostatnich lat wskazują także na udział neuroprzekaźników (glutaminianu, kwasu γ -aminomasłowego (GABA)) i monoamin (serotonina, noradrenalina i dopamina), w regulacji proliferacji, migracji, dojrzwania neuronów i synaptycznej integracji (Arias-Carrion i wsp. 2007).

Niewątpliwie, prawidłowy przebieg neurogenezy jest możliwy jedynie w odpowiednim środowisku. Pod wpływem specyficznej stymulacji środowiskowej komórki macierzyste mogą przejść z fazy spoczynkowej do proliferującej, wytwarzając komórki potomne. Kluczową rolę w tym mechanizmie przypisuje się białkom macierzy zewnątrzkomórkowej ECM i ich receptorom zlokalizowanym na powierzchni komórki.

Autorka rozprawy jest świadoma, że przytoczone dane nie wyczerpują listy potencjalnych czynników wpływających na neurogenezę. Wiedza na temat regulacji neurogenezy wieku dorosłego, pomimo ogromnej liczby dostępnych w literaturze informacji nadal ma charakter fragmentaryczny. Większość opublikowanych danych pochodzi z badań prowadzonych na hodowlach komórek macierzystych. Badania *in vivo* koncentrowały się głównie na obserwacji efektów wywołanych egzogennym podaniem wybranego białka czy związku lub zablokowaniu określonych dróg przekazu sygnału.

1. 5. Funkcjonalne znaczenie neurogenezy wieku dorosłego w warunkach fizjologicznych

Pomimo intensywnych badań nad fizjologiczną rolą procesu neurogenezy w dojrzałym mózgu, nasza wiedza na ten temat pozostaje w dalszym ciągu ograniczona. Tworzenie nowych neuronów i synaps w hipokampie jak i przebudowa „drzewek” dendrytycznych, leżą prawdopodobnie u podłoża procesu zapamiętywania, uczenia (Gould i wsp. 1999) oraz modulacji stanów lękowych (Santarelli i wsp. 2003). U szczurów poddanych treningowi umysłowemu i wykonujących zadania z użyciem pamięci hipokampalnej notowano 2- i 3-krotny wzrost liczby komórek o fenotypie neuronalnym w porównaniu ze szczurami nie poddanymi treningowi. Zgodnie z tym spostrzeżeniem, zahamowanie neurogenezy w hipokampie obniżało zdolność zwierząt eksperymentalnych do uczenia się i powtórnego wykonywania wyuczonych poprzednio zadań (Shors i wsp. 2001).

Istnieje hipoteza, że zablokowanie neurogenezy w rejonie hipokampa jest jednym z czynników prowadzących do depresji (Santarelli i wsp. 2003). Potwierdzeniem tej hipotezy mogła być skuteczność leczenia lekami antydepresyjnymi obserwowana jedynie przy zachowaniu integralnej struktury SGZ. Należy jednak uwzględnić tutaj prawdopodobny wpływ zniszczenia mikrośrodowiska w wyniku napromieniowania zakrętu zębatego w toku prowadzonych badań (Pollak i wsp. 2008). Nie można zatem określić bezpośredniego związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy depresją i obniżonym stopniem neurogenezy.

Bardziej zrozumiała wydaje się być funkcja nowych neuronów opuszki węchowej.

Prawidłowe funkcjonowanie układu węchowego wymaga zdolności dynamicznego przystosowania do zmieniającego się środowiska zapachowego poprzez wzbogacenie istniejącej sieci o nowe neurony (Carleton i wsp. 2003). Neurogeneza jest więc w tym przypadku składową mechanizmu adaptacji, zapewniającą plastyczność i szybką przebudowę połączeń synaptycznych w odpowiedzi na zmiany środowiska. Wzbogacone środowisko zapachowe promuje podziały komórkowe w obszarze okołokomorowym (SVZ), co wiąże się z uwrażliwieniem i wydłużaniem pamięci węchowej u badanych zwierząt (Rochefort i wsp. 2002). Sugeruje się ponadto, że neurogeneza promuje rozróżnianie zapachów (Alvarez-Buylla i Garcia-Verdugo 2002).

1. 6. Neurogeneza w patologii ośrodkowego układu nerwowego.

Wpływ niedokrwienia mózgu

Interesujące wyniki badań eksperymentalnych zgromadzone w ostatnich latach wskazują na znaczącą aktywację procesów neurogenezy u dorosłych zwierząt w niektórych stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Obserwacje te skłaniają do sugestii, że w niektórych sytuacjach środowisko ograniczające neurogenezę w warunkach fizjologicznych z nieznanymi przyczynami staje się permissive dla rozwoju komórek nerwowych.

Podwyższoną znacznie aktywność proliferacyjną w strefach SGZ i SVZ a następnie migrację do uszkodzonych, czasami odległych, struktur mózgowia i różnicowanie do odpowiednich fenotypów opisano w chorobach zwyrodnieniowych OUN (Jin i wsp. 2004), po urazach mechanicznych (Parent 2003) oraz w wyniku różnych typów niedokrwienia - zarówno ogniskowego jak i całkowitego (Kawai i wsp. 2006; Sharp i wsp. 2002; Zhang i wsp. 2008). Co ciekawe, proliferację endogennych progenitorów obserwowano nie tylko w znanych okolicach neurogennych, ale także w rejonach, w których nie obserwowano neurogenezy w warunkach fizjologicznych (Johansson i wsp. 1999; Yamamoto i wsp. 2001).

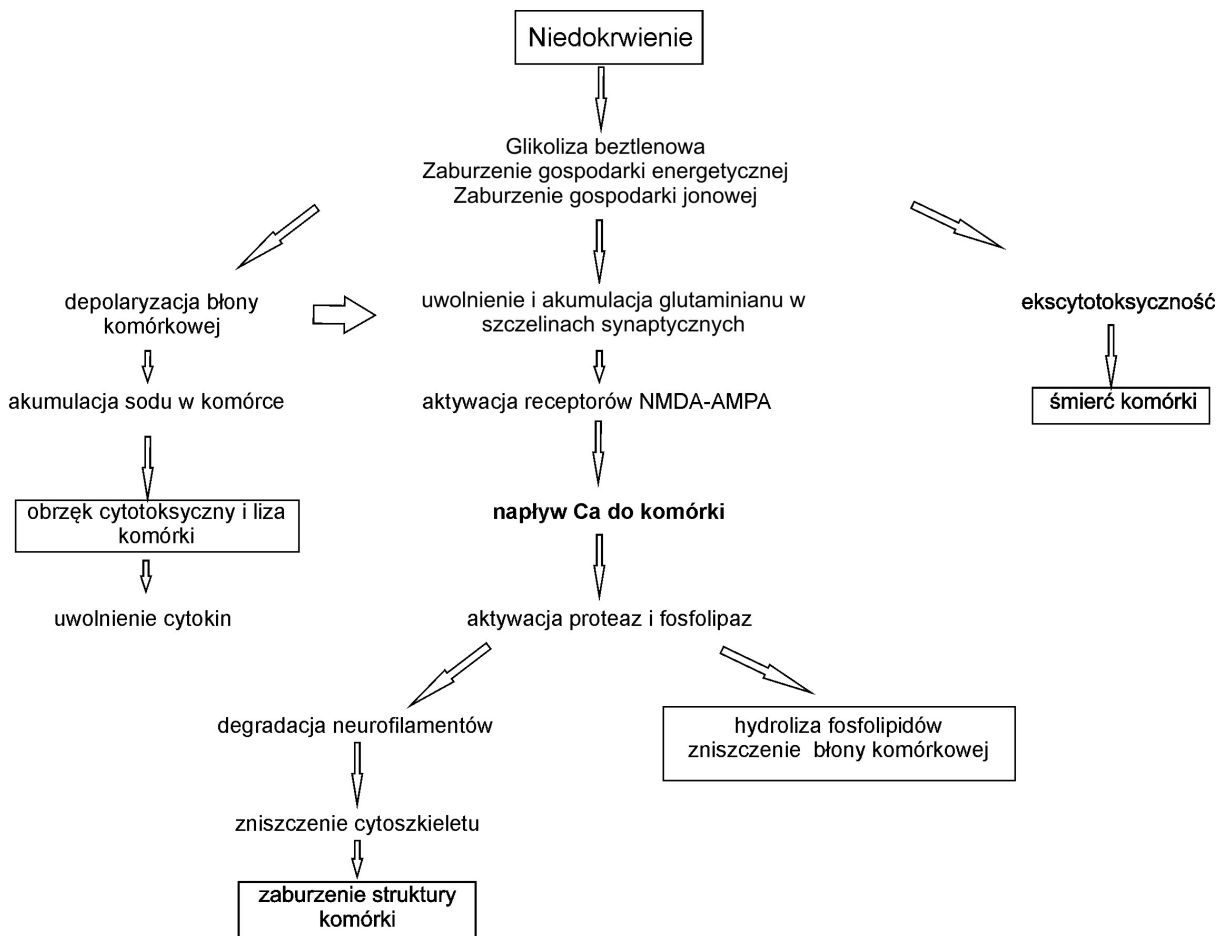
Nasiloną proliferację komórek w SVZ i SGZ, ich migrację w kierunku uszkodzonej struktury prążkowiec a następnie różnicowanie w neurony opisano w modelu udaru mózgu (Arvidsson i wsp. 2002; Jablonska i wsp. 2010; Jin i wsp. 2001; Sharp i wsp. 2002; Zhang i wsp. 2008). Około 60% nowych komórek prezentowało fenotyp neuronalny. Stymulację neurogenezy obserwowano również w wyniku całkowitego niedokrwienia mózgu dorosłych zwierząt. Liczba komórek BrdU-pozytywnych wyraźnie wzrastała w warstwie podziarnistej DG (Liu i wsp. 1998; Sharp i wsp. 2002; Zhang i wsp. 2008). Modelowym przykładem stymulacji neurogenezy w następstwie całkowitego niedokrwienia mózgu dorosłych myszokoczków mongolskich jest praca Schmidta i Reymanna dokumentująca w sposób niezwykle czytelny wzrost proliferacji w zakręcie zębatym hipokampa a następnie pojawienie się nowopowstałych neuronów w uszkodzonym przez epizod niedokrwienno rejonie CA1 (Schmidt i Reymann 2002). Regenerację uszkodzonych piramidowych neuronów hipokampa po niedokrwieniu

mózgu szczura opisał również Nakatomi i wsp. (Nakatomi i wsp. 2002).

Czynniki stymulujące neurogenezę po niedokrwieniu nie zostały w pełni zdefiniowane. Sugeruje się, że liczne z nich, zaangażowane w regulację neurogenezy u zdrowych osobników, biorą również udział w odpowiedzi neurogennej po uszkodzeniu niedokrwinnym (Lichtenwalner i Parent 2006).

Uwalnianie neuroprzekaźników pobudzających i aktywacja ich receptorów w wyniku niedokrwienia mózgu inicjuje szereg zaburzeń procesów biochemicznych i molekularnych, które mogą bezpośrednio lub pośrednio wpływać na ekspresję i uwalnianie szeregu molekuł (takich jak chemokiny, czynniki wzrostu i neurotrofiny, morfogeny, enzymy proteolityczne, molekuły macierzy zewnątrzkomórkowej) mogących mieć wpływ stymulujący lub hamujący na poszczególne etapy neurogenezy (Lichtenwalner i Parent 2006). Istnienie wielu proponowanych mechanizmów, które mogą być uruchamiane w warunkach patologii niedokrwiennej, jest przejawem ogromnej złożoności tych procesów. Najbardziej prawdopodobnym wydaje się być uruchamianie kilku różnych mechanizmów, działających raczej kooperacyjnie aniżeli sekwencyjnie.

W skomplikowanym obrazie wzajemnych połączeń i współzależności reakcji poniedokrwienych (Rycina 3) znaczącą rolę wydają się pełnić zaburzenia środowiska zewnątrzkomórkowego, niosące za sobą zmianę prawidłowego kontaktu komórki z macierzą zewnątrzkomórkową. Konsekwencją tych zdarzeń może być dodatkowa modulacja wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnałów, które mogą ukierunkowywać los komórek w stronę ich śmierci lub przeżycia. Postuluje się ponadto, że niektóre z tych dróg sygnałowych, mogą uczestniczyć w procesie neurogenezy poniedokrwiennej wpływając między innymi na ekspresję genów (Kalluri i Dempsey 2008). Niewątpliwie jednak, zarówno z uwagi na heterogenność tkanki jak i stymulację różnorodnych szlaków przekazywania sygnału, nasza wiedza o przebiegu tego procesu jest ciągle pełna luk i nieścisłości. W oparciu o dane literatury, wskazujące na znaczenie środowiska zewnątrzkomórkowego w neurogenezie embrionalnej, postanowiono omówić szerzej rolę macierzy zewnątrzkomórkowej, enzymów biorących udział w jej proteolitycznym przemodelowaniu oraz wewnątrzkomórkowe ścieżki przekazywania sygnału z otaczającego komórki środowiska.



Rycina 3. Uproszczony schemat szlaków sygnałowych indukowanych niedokrwieniem.

1. 7. Macierz zewnątrzkomórkowa

Macierz zewnątrzkomórkowa (ECM) jest podstawowym elementem wypełniającym przestrzenie między komórkami. Stanowi ona około 20% całkowitej masy mózgu. Składa się z szeregu różnych cząsteczek połączonych zarówno pomiędzy sobą jak i z białkami błon komórkowych. W ten sposób tworzy się przestrzenna sieć stanowiąca rusztowanie dla komórek. Głównymi składnikami macierzy są glikozaminoglikany (wolne lub połączone z białkami), białka włóknikowe (kolageny, elastyna, fibrylina) oraz glikoproteiny, w tym glikoproteiny fibrylarne (fibronektyna, laminina, kolageny, witronektyna, tenascyna). Glikoproteiny fibrylarne, chociaż występują w tkance nerwowej w mniejszej ilości aniżeli w innych tkankach, pełnią w niej istotną rolę. Elementy ECM, na przykład izoformy lamininy oraz kolagen IV, wspomagają wzrost wypustek nerwowych (Novak i Kaye 2000; Wright i wsp. 2002). Istotnym składnikiem macierzy ośrodkowego układu nerwowego jest występujący w stanie wolnym (nie połączony z białkami) glikozaminoglikan – hialuronian. Pozostałe glikozaminy, w tym istotne w procesach plastycznych pochodne siarczanu chondroityny, połączone są z rdzeniem białkowym tworząc proteoglikany (Berardi i wsp. 2004). Proteoglikany decydują o prawidłowym zespoleniu

komórek ze sobą oraz z otaczającą ich macierzą. Specyficznymi, występującymi tylko w mózgu proteoglikanami należącymi do grupy agrekanu, są neurokan i brewikan. Wiążą się do białek adhezji komórkowej i biorą udział w regulacji tego procesu. Kontrolują ponadto wzrost dendrytów oraz synaptogenezę (Galtrey i Fawcett 2007; Rauch 2004).

Szczególną formą macierzy są sieci około neuronalne (PNN, Perineuronal Nets). Są to siatkowate struktury powstałe na drodze agregacji niektórych składników. Struktury te otaczają ciała dojrzałych komórek nerwowych, głównie GABA-ergicznych, oraz aksony i dendryty, tworząc swego rodzaju izolację dla poszczególnych neuronów (Celio i wsp. 1998). W układzie nerwowym składniki macierzy są produkowane i wydzielane na zewnątrz zarówno przez komórki neuronalne jak i glejowe.

Własności fizyczne elementów macierzy zapewniają stabilność mechaniczną i utrzymanie przestrzennej organizacji tkanki. Polisacharydy charakteryzują się wysokim stopniem hydrofilności i łatwością tworzenia żeli i dzięki tym właściwościom są odporne na działanie sił ściskających. Białka natomiast prezentują wysoką odporność na rozciąganie.

Rola ECM nie ogranicza się do tworzenia podpory dla komórek nerwowych. Jest ona niezbędna dla utrzymania homeostazy jonowej, zapewnia odżywianie neuronów i gleju oraz bierze czynny udział w regulacji aktywności synaptycznej (Wright i wsp. 2002). Macierz zewnątrzkomórkowa pełni też rolę „magazynu” cząsteczek sygnałowych takich jak cytokiny i czynniki wzrostu (Mott i Werb 2004).

Elementy ECM wpływają na funkcjonowanie i aktywność komórek poprzez regulację ich odpowiedzi na sygnały pochodzące ze środowiska. Oddziaływanie komórek z ECM odbywa się przy udziale powierzchniowych cząsteczek adhezji komórkowej (CAM, Cell Adhesion Molecules) oraz ich receptorów. W ośrodkowym układzie nerwowym szczególną rolę odgrywają receptory integrynowe, z którymi wiążą się białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Rolę integryn w utrzymaniu komórek macierzystych i progenitorów we właściwej pozycji w niszach, ich udział w aktywacji szlaków transdukcji sygnałów koniecznych dla proliferacji i przeżycia, udokumentowano początkowo w badaniach nie-neuronalnych komórek macierzystych (komórki macierzyste keratynocytów i krypt jelitowych) (Fuchs i Segre 2000; Rao i Civin 2005). Obecnie podkreśla się także ich znaczącą rolę w OUN.

Inne typy receptorów to receptor dla hialuronianu – CD44, regulujący migrację komórek w czasie rozwoju embrionalnego i w inwazji nowotworów (Naor i wsp. 1997) oraz receptory typu N-CAM (ang. Neural Cell Adhesion Molecules) zaangażowane w adhezję komórkową (Storms i wsp. 1996).

Na podstawie dostępnych danych można śmiało wysunąć hipotezę, że skoordynowane współdziałanie elementów ECM i receptorów powierzchni komórki oraz aktywność komórkowych białek leżących na szlaku przekazywania sygnału jest konieczne dla prawidłowego przebiegu podstawowych procesów biologicznych takich jak proliferacja, migracja, różnicowanie, plastyczność synaptyczna i apoptoza (Wright i wsp. 2002).

1. 7. 1. Rola macierzy zewnątrzkomórkowej w neurogeniezie

Nasza dotychczasowa wiedza, dotycząca roli elementów ECM w neurogeniezie, oparta jest na wynikach badań *in vitro*. Obecność białek macierzy, a szczególnie fibronektyny i lamininy, w hodowli embrionalnych komórek macierzystych jak i progenitorów neuralnych z krwi pępowinowej stymulowała znacząco proliferację, migrację i różnicowanie w kierunku neuronów oraz wzrost neurytów (Buzanska i wsp. 2009; Ma i wsp. 2008; Mruthyunjaya i wsp. 2010; Szymczak i wsp. 2010; Tate i wsp. 2004). Wpływ na różnicowanie komórek P12 oraz embrionalnych progenitorów korowych miał również kolagen I i IV (Cooke i wsp. 2010; O'Connor i wsp. 2001), przy czym kolagen IV hamował równocześnie proliferację (Ali i wsp. 1998; Szymczak i wsp. 2010).

Opisany przez Letourneau wzrost objętości macierzy zewnątrzkomórkowej w czasie migracji progenitorów neuralnych, ich różnicowania i wydłużania aksonów, może również sugerować wpływ jej elementów na rozwój komórki (Letourneau i wsp. 1994). Po zakończeniu dojrzewania komórki ekspresja białek ECM ulegała redukcji.

Jak już wspomniano w tej rozprawie, ECM jest strukturą dynamiczną i ulega przemodelowaniu podczas rozwoju komórek nerwowych. Kontrolowana precyzyjnie przez proteazy degradacja białek ECM najpewniej zmienia charakter oddziaływań pomiędzy komórkami a otaczającym je środowiskiem i w ten sposób wpływa na poszczególne etapy rozwoju komórki. Zgodnie z takim założeniem, ścisła interakcja komórka/ECM mogłaby promować proliferację, natomiast osłabienie czy inhibicja wzajemnych oddziaływań byłaby sygnałem inicjującym migrację nowopowstałych komórek do miejsc przeznaczenia i różnicowanie do odpowiedniego fenotypu. W tym kontekście enzymy, które modyfikują ECM i molekuly adhezyjne, wydają się być szczególnie interesujące.

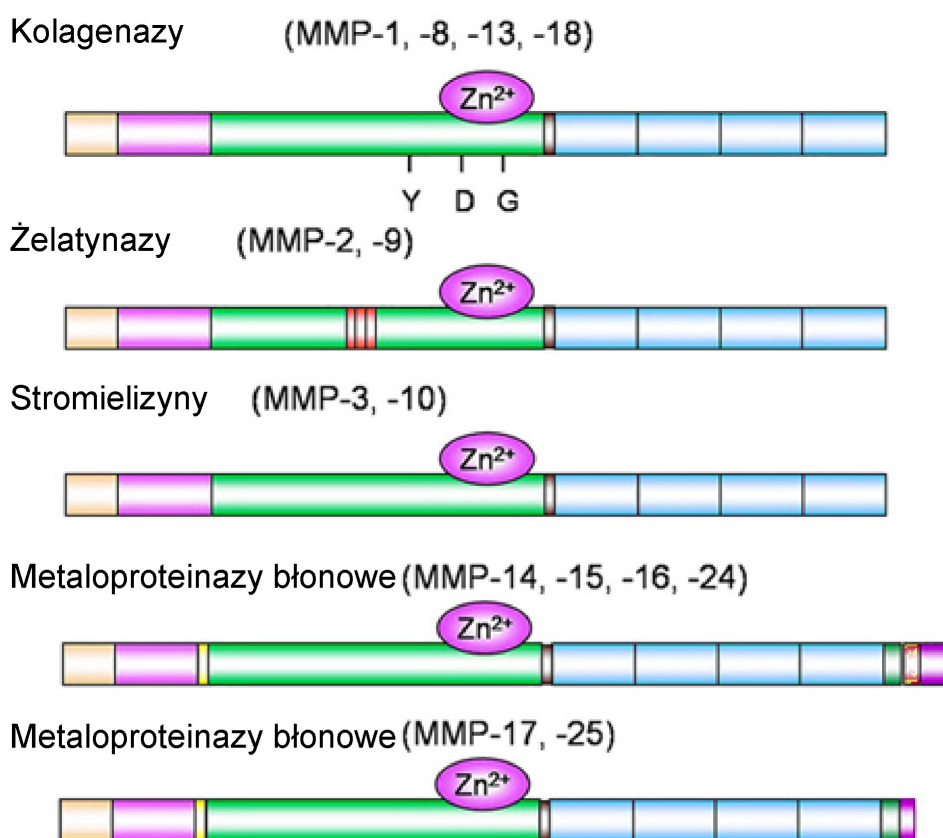
1. 8. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs)

1. 8. 1. Charakterystyka ogólna metaloproteinaz

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs), zwane inaczej matryksynami, tworzą rodzinę składającą się z 28 różnych enzymów proteolitycznych (kodowanych przez różne geny), z czego 24 znaleziono u ssaków i nadano im kolejne numery (Morrison i wsp. 2009). MMP należą obok seralizyn, astacyln i proteaz ADAM (posiadających domenę dezintegryny i metaloproteinazy, (ang. A Disintegrin And Metalloproteinase) do grupy metzyncyn w obrębie nad-rodziny metaloproteinaz. Metzyncyny charakteryzują się konserwowaną strukturą centrum katalitycznego (zawierającym trzy histydyny wiążące jony cynku (Ethell i Ethell 2007)). Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej są endopeptydazami wydzielanymi do przestrzeni zewnątrzkomórkowej lub zakotwiczonymi w błonie. Na podstawie różnic

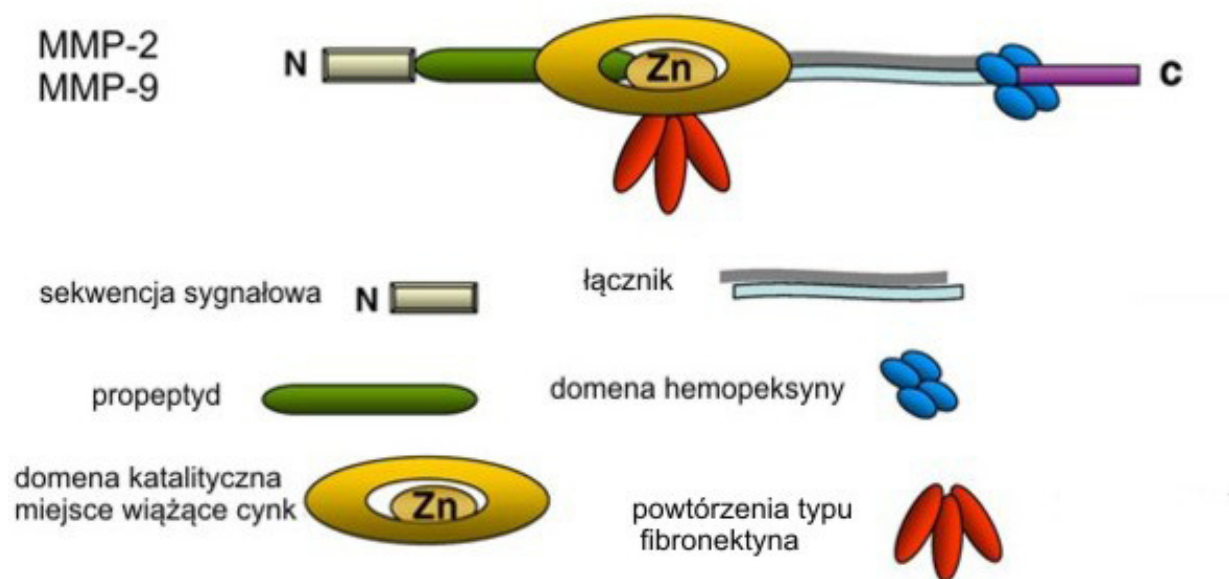
struktury domen MMPs podzielono je na 4 główne podgrupy: kolagenazy, stromielizyny, żelatynazy i metaloproteinazy błonowe (MT-MMPs, ang. membrane type MMPs) (Fanjul-Fernandez i wsp. 2010).

Przez wiele lat uważano, że aktywne formy MMPs zlokalizowane są wyłącznie zewnątrzkomórkowo a ich podstawowym substratem są molekuly macierzy zewnątrzkomórkowej. Badania ostatnich lat dostarczyły dowodów na zdolność tych enzymów również do proteolizy substratów wewnątrzkomórkowych (Kim i wsp. 2005; Schulz 2007). Obecność aktywnych form MMP-2, MMP-9, i MMP-13 wykazano w jądrach komórek neuronalnych i glejowych



Rycina 4. Struktura białek rodziny metaloproteinaz (zmodyfikowana).

(Cuadrado i wsp. 2009; Sbai i wsp. 2010; Wojcik-Stanaszek i wsp. 2011). Kontrolowana proteoliza licznych substratów MMPs, na przykład czynników wzrostu, cytokin, receptorów, enzymów naprawy DNA, białek macierzy zewnątrzkomórkowej, białek adhezyjnych, prowadzi do przemodelowania tkanki nerwowej, co jest warunkiem prawidłowego przebiegu procesów fizjologicznych (procesów rozwojowych, migracji i różnicowania komórek macierzystych). Zaburzenie mechanizmów kontrolujących aktywność metaloproteinaz ma udział w szeregu patologii OUN (neurodegeneracje, stany zapalne progresja guzów) (Mannello i Medda 2012; Sternlicht i Werb 2001).



Rycina 5. Schemat budowy żelatynaz: MMP-2 i -9. Rycina opracowana przez Netta Sela-Passwell i wsp. (Sela-Passwell i wsp. 2010), zmodyfikowana.

1. 8. 2. Struktura molekularna metaloproteinaz

Większość znanych metaloproteinaz składa się z 5 podstawowych domen białkowych. Pierwsza z nich znajduje się na końcu aminowym łańcucha polipeptydowego (N'-koniec). Jest to sekwencja sygnałowa odpowiedzialna za sekrecję enzymu z siateczki śródplazmatycznej w kierunku błony komórkowej. Następną domeną jest domena pro-peptydowa o długości około 80 aminokwasów. Zawiera ona wysoce konserwatywny motyw Pro-Arg-Cys-Gly(Val-/Asn-)Pro-Asp-. Cysteina wchodząca w skład tej domeny wiąże się poprzez grupę -SH z niezbędnym do aktywacji jodem cynku, zapewniając utrzymanie enzymu w formie nieaktywnej. Domena katalityczna metaloproteinaz zbudowana jest z około 170 aminokwasów. Zawiera ona kolejny wysoce konserwatywny motyw: His-Glu-X-X-His-X-X-Gly-X-X-His, w którym 3 histydyny stanowią miejsce wiązania cynku (o czym wspomniano wyżej). W domenie katalitycznej znajduje się także tzw. zakręt metioninowy, który wraz z histydynami tworzy miejsce aktywne enzymu (Mannello i Medda 2012; Sternlicht i Werb 2001). Pomędzy domeną katalityczną

a końcem karboksylowym znajduje się odcinek polipeptydowy różnej długości u poszczególnych MMPs, pełniący funkcję "łącznika" (ang. hinge region). Wpływa on na specyficzność substratów enzymów. Na końcu karboksylowym znajduje się ostatnia z domen (licząca około 210 aminokwasów) mająca strukturę podobną do hemopeksyny (ang. hemopexin-like domain). Hemopeksyna to głównie białko krwi, bardzo wydajnie wiążące wolny hem. Poprzez C-kończącą domenę hemopeksyno-podobną MMPs mogą wiązać heparynę a także wchodzić w interakcje z tkankowymi inhibitorami metaloproteinaz - TIMP (ang. tissue inhibitor of metalloproteinases) (Nagase i Woessner, Jr. 1999). Domena ta u większości metaloproteinaz zaangażowana jest w wiązanie białek macierzy (Roeb i wsp. 2002).

Budowa różnych metaloproteinaz nie jest jednakowa. MMP-7 i -26 zbudowane są tylko z 3 domen: sekwencji sygnałowej, pro-domeny oraz domeny katalitycznej. W MMP-2 i MMP-9, noszących nazwę żelatynaz (odpowiednio A i B), w domenie katalitycznej znajdują się 3 tandemowe bogate w cysteinę powtórzenia (każde o długości 58 aminokwasów), podobne do domeny typu drugiego fibronektyny. Domena fibronektynowa żelatynaz wiąże kolagen oraz elastyny. Metaloproteinaza 9 w rejonie łącznika posiada dodatkową domenę typu kolagenu V, jednak jego rola do tej pory nie została wyjaśniona (Sternlicht i Werb 2001). Ponieważ żelatynazy są tematem części moich badań, zamieściłam bardziej czytelny schemat ich budowy (Ryc. 5).

1. 8. 3. Mechanizmy regulacji metaloproteinaz

W warunkach fizjologicznych metaloproteinazy mają zapewnić odpowiednie środowisko zewnątrzkomórkowe, prawidłowe interakcje pomiędzy komórkami poprzez utrzymanie odpowiedniej struktury macierzy zewnątrzkomórkowej oraz regulację sygnałów zewnątrzkomórkowych. Utrzymanie fizjologicznego poziomu proteolizy substratów wymaga precyzyjnej kontroli aktywności MMPs. Aktywność MMPs podlega regulacji na 3 głównych poziomach: transkrypcji, aktywacji oraz inhibicji.

W zależności od pełnionej funkcji, lokalizacji oraz specyficzności substratowej, MMPs różnią się profilem ekspresji genów. Ekspresja ta zależy od wielu czynników, zarówno aktywujących (czynniki wzrostu, cytokiny, czynniki chemiczne, transformacje onkogenne komórki) jak i hamujących (transformujący czynnik wzrostu β – TGF- β (ang. transforming growth factor), kwas retinowy, glikokortykoidy) (Nagase i Woessner, Jr. 1999). Liczne czynniki aktywujące, na przykład interleukiny, czynniki wzrostu, interferony czy czynnik indukcyjny metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (EMMPRIN, ang. extracellular matrix metalloproteinase inducer) wpływają na ekspresję i/lub aktywację proto-onkogenów: c-fos i c-jun tworzących heterodimery funkcjonujące jako czynnik transkrypcyjny AP-1. AP-1 wiąże się do specyficznej sekwencji DNA w rejonie promotorowym genu i stymuluje proces transkrypcji MMPs. Drugim czynnikiem transkrypcyjnym jest Nf kappa B. Na transkrypcję genów MMPs wpływają także receptory integrynowe oraz białka macierzy i ich fragmenty

proteolityczne. Przykładem może być kolagen, który indukuje ekspresję MMP-1, podczas gdy jego fragment proteolityczny ma działanie przeciwne i hamuje produkcję MMP-1 (Sternlicht i Werb 2001).

Większość metaloproteinaz syntetyzowana jest w postaci nieaktywnego proenzymu (zymogenu). Aktywacja zymogenu następuje poprzez dysocjację wiązania cysteina-cynk (tzw. cysteine-switch). Jedną z najlepiej poznanych dróg aktywacji jest odcięcie domeny proenzymu na drodze proteolizy. Na przykład plazmina powstająca w wyniku działania urokinazowego aktywatora plazminogenu ma zdolność aktywacji wielu MMPs. Podobną rolę mogą pełnić inne proteinazy, takie jak MMP-2 czy stromielizyna, zdolne do aktywacji MMP-9 (Yong i wsp. 1998). W obecności związków reagujących z grupami sulfhydrylowymi (wolne rodniki, nadtlenki, związki metali ciężkich) może również dojść do indukcji aktywnej formy metaloproteinaz (Nagase i Woessner, Jr. 1999; Ra i Parks 2007; Sternlicht i Werb 2001).

Unikalnym przykładem aktywacji jest proenzym MMP-2. Jest on aktywowany przy udziale MT1-MMP (MMP-14) oraz TIMP-2 – tkankowego inhibitora metaloproteinaz. Zlokalizowana w błonie MT1-MMP łączy się z N-końcową domeną TIMP-2. Z kolei C-końcowa domena związanego inhibitora działa jako receptor dla domeny hemopeksyny w pro-MMP-2. Związanie pro-MMP-2 przez TIMP-2 umożliwia odcięcie propeptydu przez MT1-MMP i aktywację metaloproteinazy 2 (Strongin i wsp. 1995). Metaloproteinazy błonowe oraz MMP-11 i MMP-23 aktywowane są wewnątrzkomórkowo przez konwertazę furyny.

Aktywność metaloproteinaz jest również kontrolowana przez ich specyficzne inhibitory tkankowe – TIMP, które formują kompleks z enzymem w stosunku 1:1. Inhibicja ma charakter odwracalny. Do chwili obecnej poznano 4 tkankowe inhibitory MMPs. Są to białka o ciężarze 21-30 kDa, zbudowane z dwóch podstawowych domen. Domenę N-końcową tworzy odcinek polipeptydowy (homologiczny u wszystkich 4 inhibitorów), który oddziałuje z centrum aktywnym enzymów i blokuje ich aktywność. Domena C-końcowa wpływa na połączenie inhibitora z fragmentem polipeptydowym metaloproteinaz o charakterze hemopeksyny. Poszczególne TIMPs charakteryzują się różnym stopniem specyficzności dla poszczególnych metaloproteinaz. Na przykład TIMP-1 hamuje aktywność MMP-9 i ma najbardziej ograniczony zakres działania. TIMP-2 nie tylko hamuje MMP-2, ale paradoksalnie ma udział w jej aktywacji. TIMP-3 ma najszerszy zakres działania i jest jedynym inhibitorem związanym z ECM. TIMP-4 znaleziono w wielu tkankach i sugeruje się, że jest zaangażowany w specyficzne tkankowo funkcje fizjologiczne. Oprócz bezpośredniego wiązania TIMP mogą łączyć się w większe kompleksy z pro-żelatynazą A tworząc – LIMP (ang. large inhibitor of metalloproteinases). Blokują one stromielinazy, kolagenazy i żelatynazę A.

Pierwotna koncepcja zakładała, że równowaga pomiędzy poziomem aktywnych MMPs i ich inhibitorów reguluje aktywność proteolityczną. Okazało się jednak, że wielu efektów aktywności TIMP w procesach biologicznych nie można tłumaczyć wyłącznie inhibicją MMPs. Inhibitory tkankowe pełnią swoje własne, nie sprecyzowane do końca, funkcje.

Obok omawianych TIMPów inhibitorami metaloproteinaz są także $\alpha 2$ -makroglobuliny.

Inhibicja przy udziale α 2-makroglobuliny ma charakter nieodwracalny a utworzony kompleks usuwany jest na drodze endocytozy.

1. 8. 4. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej w fizjologii i patologii OUN

Proteoliza białek ECM, prowadząca do jej przebudowy, jest procesem niezbędnym dla prawidłowego przebiegu rozwoju zarodkowego i morfogenezy tkanek. Wskazuje to na udział metaloproteinaz w podstawowych procesach biologicznych (Vu i Werb 2000). Metaloproteinazy zaangażowane są w poszczególne etapy rozwoju i dojrzewania układu nerwowego. Na podstawie badań wzoru ekspresji mRNA i białka enzymatycznego różnych MMPs w rozwoju embrionalnym i postnatalnym można wnioskować, iż ekspresja tych białek zmienia się w czasie rozwoju mózgu (Cunningham i wsp. 2005; Fager i Jaworski 2000; Hayashita-Kinoh i wsp. 2001; Rivera i wsp. 1997). Prawdopodobnie poszczególne enzymy tej rodziny pełnią odmienne funkcje, ponieważ różne struktury i typy komórek prezentują odmienny poziom ekspresji tych białek na kolejnych etapach rozwoju. U 15 dniowych zarodków mysich zwiększony poziom mRNA MMP-9 w komórkach progenitorowych korelował czasowo i przestrzennie z rozwijającymi się strukturami: przysadką, spletem naczyńnkowym czy zwojami nerwowymi siatkówki jak i z agregatami komórek mających brać udział w organizacji silnie unaczynionej istoty szarej (Canete i wsp. 1995; Canete-Soler i wsp. 1995). Wyniki badań prowadzonych na oseskach mysich z wyciszonym genem MMP-9 wskazują na zaangażowanie tej żelatynazy B w regulację migracji i programowanej śmierci prekursorów komórek ziarnistych w czasie rozwoju mózdzku. Udział żelatynazy B w procesie migracji oraz wydłużania aksonów został potwierdzony wynikami badań *in vitro* na komórkach izolowanych z mózdzku 12-15 dniowych osesków mysich. Autorzy postulują także włączenie tego enzymu w intensywnie przebiegającą w tym czasie synaptogenezę (Vaillant i wsp. 1999; Vaillant i wsp. 2003). Luo udokumentował wpływ MMP- 2 i -9 na morfogenezę mózdzku. W wyniku inhibicji obu żelatynaz miało miejsce zwiększenie objętości zewnętrznej warstwy ziarnistej oraz spowolnienie migracji w warstwie molekularnej skrawków organotypowych mózdzku (Luo 2005). Zaobserwowano ekspresję białka MMP-9 oraz aktywnej formy tego enzymu w czasie procesu mielinizacji w rozwijającym się nerwie wzrokowym mysich osesków. Udział metaloproteinaz w procesie mielinizacji potwierdziły badania *in vitro* dokumentujące obecność aktywnych form MMP-2 i -9 w wypustkach oligodendrocytów oraz hamowanie ich wzrostu poprzez inhibicję wymienionych enzymów (Oh i wsp. 1999).

Zmiany struktury macierzy zewnątrzkomórkowej w wyniku degradacji proteolitycznej uważane są za niezbędny element niektórych form plastyczności synaptycznej dorosłego mózgu (Kaczmarek i wsp. 2002; Wright i Harding 2004). Kluczową rolę przypisuje się dwóm żelatynazom: MMP-2 i MMP-9. Obecność obu proteinaz znaleziono w neuronach, astrocytach oraz komórkach mikrogleju u ludzi i gryzoni (Cuzner i wsp. 1996; Planas i wsp. 2001; Wojcik

i wsp. 2009; Wojcik-Stanaszek i wsp. 2011).

Zaburzenie mechanizmów kontrolnych i nadmierna aktywacja zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych towarzyszy licznym stanom patologicznym OUN. Znaczącą aktywację metaloproteinaz w tkance nerwowej obserwowano między innymi w patologii niedokrwiennej mózgu i rdzenia, arteriosklerozie, w przewlekłych chorobach autoimmunologicznych i zwyrodnieniowych – stwardnieniu rozsianym (SM, Sclerosis Multiplex) i w chorobie Alzheimerera oraz w chorobach nowotworowych. Należy jednak zaznaczyć, że doświadczenia z użyciem modeli zwierzęcych typu nokaut nie wykazały jednoznacznie żadnej przewlekłej choroby OUN związanej bezpośrednio z mutacjami w poszczególnych genach MMP. Podobnie jak wyniki doświadczeń ze zwierzętami transgenicznymi, u których ma miejsce zwiększona ekspresja pojedynczych genów MMP. Wskazują one jedynie na udział niektórych z tych białek w inwazji i angiogenezie nowotworów. Warto zaznaczyć, że żaden z modeli myszy typu nokaut nie był letalny. Wynika to prawdopodobnie z kompensacji braku pojedynczego białka MMP przez inne enzymy.

Przeważająca część badań nad rolą białek MMP w mózgu dotyczy udziału tych enzymów w chorobach nowotworowych, szczególnie w glejakach. Jest to jeden z czynników potencjalnie ułatwiających progresję nowotworu. Przebudowa ECM umożliwia migrację komórek nowotworowych. Ponadto podwyższona aktywność metaloproteinaz stymuluje angiogenezę w okolicy guza, wpływa na proliferację i przeżycie komórek nowotworowych. Wykazano, iż stopień złośliwości wielu glejaków jest skorelowany z aktywnością niektórych proteaz (np.: MMP-2, -9 oraz MT-MMPs). Zastosowanie inhibitorów wymienionych enzymów skutkowało zahamowaniem progresji guza (Forsyth i wsp. 1999; Nakada i wsp. 2001; Yong i wsp. 2001).

Innym schorzeniem OUN, w którym białka MMP mogą odgrywać znaczącą rolę, jest stwardnienie rozsiane. U chorych pacjentów zaobserwowano zwiększony poziom MMP-9 w płynie mózgowo rdzeniowym (CSF, ang. cerebrospinal fluid) oraz wzrost mRNA MMP-9 w leukocytach i surowicy. Zwiększeniu ulegał także stosunek poziomu MMP-9 do poziomu jego inhibitora tkankowego TIMP1 (Gijbels i wsp. 1992; Lichtinghagen i wsp. 1999; Yong i wsp. 2001). Badania tkanki nerwowej chorych na SM wykonane *post mortem* wykazały podwyższoną ekspresję MMP-2, -3, -7 i -9 w obszarach mózgu objętych procesem zapalnym (Cuzner i wsp. 1996). Główne źródło MMPs stanowiły limfocyty i makrofagi oraz komórki tkanki nerwowej: mikroglej, astrocyty czy neurony (Anthony i wsp. 1997; Yong i wsp. 2001).

Podwyższony poziom MMPs (MMP-9 i MMP-7) zanotowano w mózgach zwierząt w modelu eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu (EAE, ang. Experimental Allergic Encephalomyelitis). Sugeruje się, że wzrost aktywności enzymów powoduje degradację błony podstawnej i zwiększoną przepuszczalność naczyń a w konsekwencji przechodzenie komórek zapalnych z krwi do mózgu. W wyniku tego procesu dochodzi między innymi do zniszczenia otaczającej aksony osłonki mielinowej.

Należy dodać, że niektóre metaloproteinazy mają zdolność do proteolitycznego cięcia

czynników pro-zapalnych takich jak czynnik martwicy nowotworu - proTNF (ang. tumor necrosis factor), proTGF- α , IL-6 (interleukina 6) i przekształcania ich w formy aktywne (Yong i wsp. 2001).

Prowadzone są badania mające na celu wyjaśnienie roli MMPs w chorobie Alzheimera (AD, ang. Alzheimer Disease). Zaobserwowano, że białko MMP-9 ulega ekspresji w neuronach hipokampa u pacjentów chorych na AD. Poza tym poziom aktywności MMP-9 w osoczu chorych na AD jest znacząco wyższy w porównaniu z osobnikami zdrowymi (Lorenzl i wsp. 2003), przy zachowaniu niezmiennego poziomu MMP-2, TIMP-1 i TIMP-2. Natomiast stwierdzono obecność białek TIMP *post mortem* u chorych na AD (Peress i wsp. 1995). Autorzy tych badań sugerują, że dochodzi do wzmożonej produkcji lub aktywacji MMP w miejscu powstania złożeń beta-amyloidu, gdyż białka TIMP lokalizują się w miejscu aktywnej proteolizy.

Wzrost aktywności metaloproteinaz w mózgu opisano także w niedokrwieniu całkowitym i ogniskowym. W modelu ogniskowego niedokrwienia mózgu szczura obserwowano podwyższone poziomy aktywności metaloproteinaz -2 i -9, przy czym wydaje się, że w pierwszych godzinach od niedokrwienia aktywowana jest MMP-2 a dopiero później (24-48 godz.) MMP-9 (Candelario-Jalil i wsp. 2009). Aktywacja metaloproteinaz prowadzi do przerwania ciągłości bariery krew-mózg i przenikania do tkanki nerwowej elementów morfotycznych krwi. Podwyższone poziomy MMPs korelowały z dynamiką śmierci komórek nerwowych w ognisku uszkodzenia. Zastosowanie inhibitorów MMPs lub przeciwciał blokujących ich aktywność zapobiegała przerwaniu bariery krew-mózg oraz zmniejszała rozmiar udaru eksperymentalnego (Rosenberg i wsp. 1998). W autopsyjnym materiale pobranym z mózgow ludzkich podwyższone poziomy MMPs utrzymywały się jeszcze kilka dni a nawet miesięcy po przebytych udarze (Clark i wsp. 1997). Badania prowadzone w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej (IMDiK PAN) wykazały wzrost aktywności metaloproteinaz (2 i 9) we wrażliwej na niedokrwienie strukturze CA1 hipokampa w modelu całkowitego niedokrwienia przodomózgowia. Wzrost aktywności proteolitycznej korelował ze śmiercią neuronów piramidowych (Zalewska i wsp. 2002).

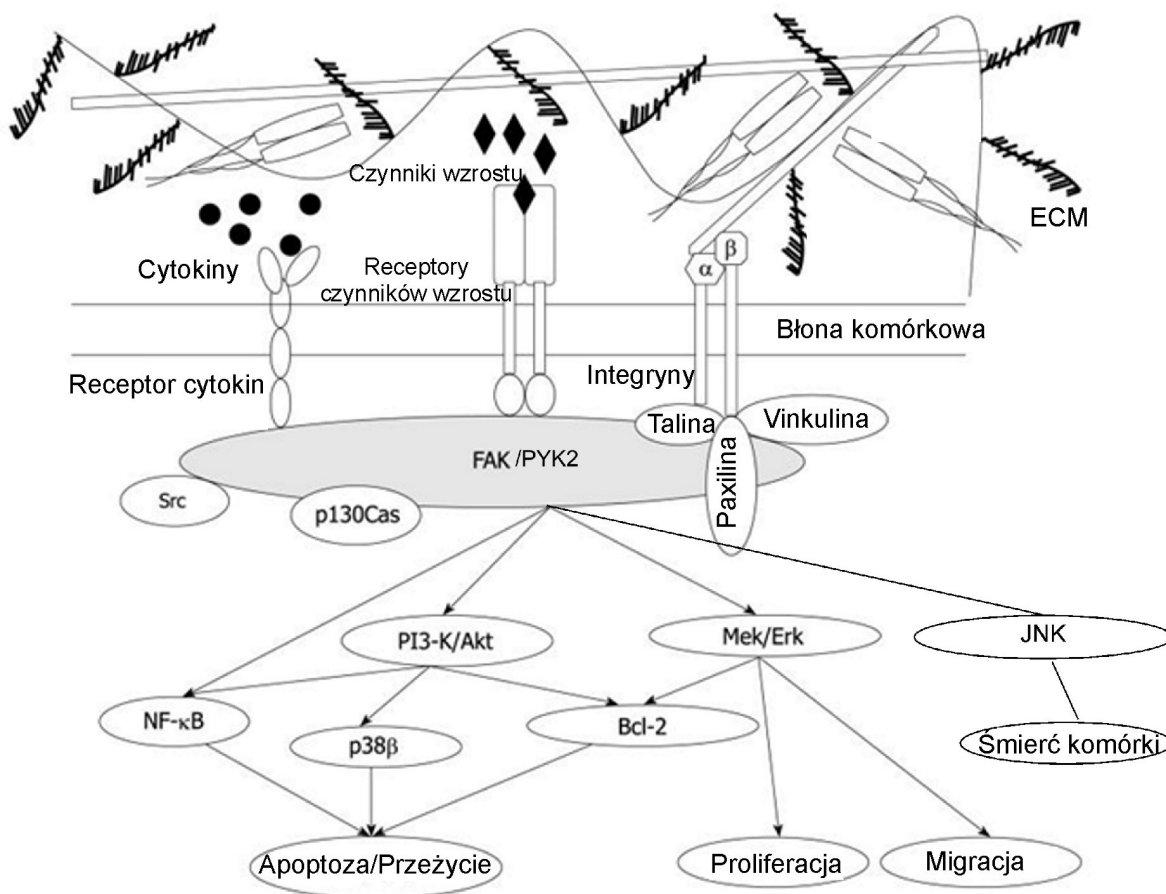
Istotnym elementem nadmiernej aktywacji metaloproteinaz jest proteoliza białek ECM (Zalewska i wsp. 2003). Powstałe na tej drodze fragmenty polipeptydowe mogą utracić zdolność wiązania z właściwymi receptorami integrynowymi. Konsekwencją tych zdarzeń może być przerwanie lub osłabienie kontaktu na linii komórka – ECM i zmiana lub nawet zahamowanie wewnątrzkomórkowego szlaku przekazywania. Końcowym efektem utraty interakcji komórki z otoczeniem jest jej śmierć określana terminem „anoikis” (Cunningham i wsp. 2005).

1. 9. Integryny i wewnętrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnałów z macierzy zewnątrzkomórkowej

Prawidłowy przebieg podstawowych procesów biologicznych takich jak proliferacja, migracja, różnicowanie czy apoptoza wymaga skoordynowanego współdziałania elementów macierzy zewnątrzkomórkowej i receptorów zlokalizowanych na powierzchni komórki. Hipotetyczny schemat takiego współdziałania ilustruje rycina 6. W OUN istotną rolę pełnią receptory zwane integrynami. Są to heterodimerskie receptory transbłonowe, zbudowane z podjednostek α i β połączonych wiązaniem nie-kowalencyjnym. Dotychczas opisano 18 podjednostek α i 8 podjednostek β , których kombinacja warunkuje specyficzność substratów receptorów (Bjorklund i Koivunen 2005; D'Abaco i Kaye 2007; Hynes 2002). Integryny nie posiadają aktywności katalitycznej, ale ulegają fosforylacji. Jest to jeden ze sposobów regulacji oddziaływań domen cytoplazmatycznych receptorów z licznymi białkami adaptorowymi i sygnałowymi (Fagerholm i wsp. 2004). Kluczowym białkiem, biorącym udział w przekazywaniu sygnałów od błonowych receptorów integrynowych do wnętrza komórki, jest niereceptorowa kinaza tyrozynowa zwana kinazą kontaktów adhezyjnych lub kinazą FAK (ang. Focal Adhesion Kinase). Umożliwia ona odpowiedź komórki na zmiany w składzie macierzy zewnątrzkomórkowej (Astier i wsp. 1997; Lim i wsp. 2004; Schlaepfer i Hunter 1998). Związanie liganda zewnątrzkomórkowego przez receptor integrynowy wywołuje zmiany konformacyjne białka kinazy, dzięki którym możliwe jest przyłączenie około 50 białek sygnałowych i strukturalnych ułożonych w hierarchicznie aktywowany kompleks adhezyjny. Kompleks ten jest nie tylko fizycznym łącznikiem między zewnątrzkomórkowym substratem, ale także miejscem inicjacji wielu komórkowych ścieżek sygnałowych, na które składają się kaskady fosforylacji szeregu białek efektorowych (Carragher i Frame 2004; Hynes 2002). Kinaza FAK jednocześnie wiąże cytoplazmatyczne domeny receptorów czynników wzrostu, przyczyniając się do integracji obu typów szlaków sygnałowych (Sieg i wsp. 2000).

Związanie domeny cytoplazmatycznej β integryny warunkuje autofosforylację Tyr 397 i odsłonięcie miejsca wiązania białek z domeną SH2, między innymi kinaz z rodziny Src. Przyłączenie kinazy Src powoduje dalsze zmiany konformacyjne i maksymalną aktywację kinazy FAK, a w konsekwencji fosforylację kolejnych tyrozyn w jej cząsteczce. Substratami aktywnej/ufosforylowanej kinazy FAK mogą być zarówno kinazy aktywowane mitogenami (MAP kinazy) jak i kinaza PI3K/Akt (ang. phosphoinositide-3-kinase/serine/threonine protein kinase Akt).

Fragmentaryczne dane literaturowe wskazują, że zarówno integryny jak i kinaza FAK oraz wymienione wyżej białka efektorowe są zaangażowane w regulację neurogenezy. Integryny $\beta 1$ biorą udział w embriogenezie (Graus-Porta i wsp. 2001), są ekspresjonowane na powierzchni ludzkich progenitorów neuralnych i biorą udział w procesie migracji i różnicowania (Marchetti i wsp. 2010; Mobley i McCarty 2011; Tate i wsp. 2004).



Rycina 6. Schemat wewnątrzkomórkowego szlaku przekazywania sygnału z ECM. Wg. van Nimwegena (van Nimwegen i van de Water 2007), zmodyfikowany.

Kinaza kontaktów adhezyjnych uczestniczy w rozwoju mózgu (Beggs i wsp. 2003) i w embriogenezie, o czym świadczy wysoka śmiertelność embrionów z wyłączoną funkcją kinazy (Ilic i wsp. 1995; Weis i wsp. 2008). Podkreślany przez wielu badaczy udział kinazy FAK w procesie proliferacji i różnicowania wynika prawdopodobnie z aktywacji kinaz MAP – kinazy ERK (ang. extracellular signal-related protein kinase) i kinazy JNK (ang. c-Jun NH2 terminal kinase) (Song i wsp. 2002b; Weston i wsp. 2002) oraz kinazy Akt/PKB (Campos i wsp. 2004; Tate i wsp. 2004). Jest to zgodne z obserwacją, że zahamowanie aktywności fosfataz tyrozynowych skutkowało wzrostem aktywności kinaz Akt/PKB i ERK oraz stymulacją proliferacji komórek progenitorowych w SVZ (Matsumoto i wsp. 2006) jak również w warstwie ziarnistej hipokampa (Shioda i wsp. 2008).

Do tej samej podrodziny białkowych kinaz tyrozynowych zaliczana jest także bogata w prolinę kinaza PYK2 (ang. proline rich tyrosine kinase 2), rozpoznana początkowo jako kinaza tyrozynowa aktywowana czynnikami podnoszącymi stężenie wewnątrzkomórkowe Ca^{2+} . PYK2 znana jest z literatury także jako $CAK\beta$, RAFTK, lub CADTK. Gen kodujący PYK2 powstał prawdopodobnie w wyniku duplikacji genu kodującego pierwotną wersję FAK. Oba geny charakteryzują się 45% homologią sekwencji nukleotydowej (Corsi i wsp. 2006).



Ekspresję PYK2 znaleziono w różnych obszarach mózgu (Avraham i wsp. 1995; Xiong i wsp. 1998). Liczni autorzy sugerują, że PYK2, podobnie jak FAK, bierze udział w przekazywaniu sygnałów z receptorów integrynowych, co zostało potwierdzone w oparciu o badania różnych typów komórek (Astier i wsp. 1997; Duong i Rodan 2000). Ufosforylowany na resztach tyrozynowych enzym aktywuje, podobnie jak FAK, kinazy MAP i kinazę Akt (Chen i wsp. 1996) i może kompensować brak kinazy FAK w komórkach nie-neuronalnych (fibroblastach i komórkach nowotworu piersi) (Fan i Guan 2011; Sieg i wsp. 1998; Ueki i wsp. 1998). Pewna ilość publikowanych danych wskazuje na negatywną rolę PYK2 w procesach regulacji cyklu komórkowego. Takie negatywne działanie ma być związane z aktywacją ścieżek sygnałowych z udziałem JNK (Zhao i wsp. 2000). Bardzo mało wiadomo na temat zaangażowania kinazy PYK2 w regulację procesów rozwojowych komórek macierzystych. Interesującym wydaje się być odkrycie obecności PYK2 w jądrach komórek OUN. Taka lokalizacja sugerować może udział kinazy w procesach transkrypcyjnych (Aoto i wsp. 2002) i być może w procesach związanych z neurogenezą.



2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Na prze strzeni ostatnich dziesięciu lat zgromadzono szereg dowodów wskazujących że niedokrwienie mózgu stymuluje neurogenezę u dorosłych gryzoni. Podwyższoną aktywność proliferacyjną progenitorów neuralnych w okolicach neurogennych: strefie okołokomorowej oraz warstwie podziarnistej hipokampa, migrację do uszkodzonych struktur mózgowia oraz różnicowanie do odpowiednich fenotypów opisano w różnych typach niedokrwienia. Mechanizmy stymulujące odpowiedź neurogenną po uszkodzeniu niedokrwieniowym dotychczas nie zostały w pełni zdefiniowane. Niedokrwienie mózgu uruchamia szereg równolegle przebiegających szlaków biochemicznych, z których każdy może wpływać na poszczególne etapy neurogenezy.

Zgodnie z ogólnie akceptowaną hipotezą głównym czynnikiem sterującym rozwojem komórek macierzystych po epizodzie niedokrwieniowym jest ich środowisko, w którym kluczową rolę pełnią białka macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) oraz ich receptory umieszczone na powierzchni komórki. Przemodelowanie struktury macierzy przy udziale aktywowanych niedokrwieniem zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych, głównie metaloproteinazy-2 i metaloproteinazy-9, zmienia charakter interakcji komórki z otaczającym środowiskiem. Konsekwencją tych zdarzeń może być modulacja wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów i podjęcie decyzji o przejściu komórki macierzystej na kolejne etapy rozwoju. Wyjaśnienie roli sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej w neurogeniezie poniedokrwiennej nie było dotychczas tematem podejmowanych prac eksperymentalnych.

Podstawowym celem podjętych badań było określenie udziału przekazywania sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej w neurogeniezie po niedokrwieniu mózgu dorosłego myszokoczka mongolskiego.

W badaniach zastosowano ogólnie akceptowany model niedokrwienia mózgu myszokoczka mongolskiego, które indukuje wybiórcze uszkodzenie neuronów piramidowych rejonu CA1 hipokampa (część grzbietowa hipokampa), przy zachowaniu niezmienionej struktury zakrętu zębatego (część brzuszna).

Dla realizacji podstawowego celu pracy zaplanowano następujące cele szczegółowe:

1. Określenie stopnia neurogenezy w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w różnym czasie po przywróceniu krążenia.
2. Określenie aktywności metaloproteinaz (żelatynaz) – metaloproteinazy 2 i metaloproteinazy 9 w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w różnym czasie po przywróceniu krążenia.
3. Zbadanie wpływu inhibitorów metaloproteinaz na proliferację i różnicowanie komórek linii HUCB-NSC.
4. Określenie ekspresji i aktywności kinaz (FAK, PYK2, Src, AKT, ERK, JNK) leżących na szlaku przekazywania sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego w różnym czasie po przywróceniu krążenia oraz w komórkach linii HUCB-NSC.

3. MATERIAŁY I METODY

3. 1. Materiał doświadczalny

Wszystkie eksperymenty przeprowadzone były na zwierzętach pochodzących z hodowli IMDiK PAN. Zwierzęta przebywały w klatkach w pomieszczeniu o standardowych warunkach laboratoryjnych (temperatura 22°C, stała wilgotność) i do momentu doświadczenia były karmione i pojone *ad libitum* z zachowaniem naturalnego cyklu dobowego.

Eksperymenty w układzie *in vivo* prowadzone były na dorosłych myszokoczkach mongolskich (*Meriones unguiculatus*) płci męskiej o masie ciała 60-70g w pierwszym dniu doświadczenia.

Procedury doświadczeń zostały zatwierdzone przez IV Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

Część badań została wykonana na stałej linii neuralnych komórek macierzystych ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB-NSC).

3. 2. Badania *in vivo*

3. 2. 1. Model całkowitego niedokrwienia mózgu.

Niedokrwienie mózgu indukowano przez zaciśnięcie chirurgicznymi klipsami naczyniowymi obu tętnic szyjnych wspólnych na okres 5 minut. W czasie zabiegu stosowano narkozę halotanową. Zwierzęta oddychały początkowo mieszaniną 2,5% halotanu w O₂/N₂O (30:70, v/v), po czym stężenie halotanu obniżano do 1,5%. Podczas zabiegu utrzymywano stałą temperaturę ciała zwierzęcia (37°C, pomiar *per rectum*) przez użycie stolika grzewczego. Po zakończeniu epizodu niedokrwienego klipsy naczyniowe usuwano. Aby zapobiec hipotermii poniedokrwiennej po zabiegu zwierzęta umieszczano na okres dwóch godzin pod lampą grzewczą. Grupę kontrolną stanowiły myszokoczki mongolskie poddane całej procedurze zabiegowej, ale bez zaciskania tętnic szyjnych. Czas przeżycia zwierząt po przywróceniu krążenia (reperfuzji) wynosił 6, 9, 11, 14, 21 i 28 dni.

Wybór myszokoczka mongolskiego podyktowany był występującą u tego gatunku anomalią budowy tętnic podstawy mózgu polegającą na braku tętnic łączących tylnych koła Willisa. Eksperymentalne zatrzymanie krążenia krwi w obu tętnicach szyjnych wspólnych prowadzi do całkowitego niedokrwienia przodomózgowia. Konsekwencją tego stosunkowo prostego zabiegu jest selektywne uszkodzenie neuronów warstwy piramidowej w rejonie CA1 (Róg Ammona, *Cornu Ammoni*) hipokampa.

3. 2. 2. Analiza wbudowania 5-bromo-2-deoksyurydyny (BrdU)

Zdolność komórek do proliferacji określano stopniem wbudowania BrdU do DNA podczas jego replikacji w fazie S cyklu komórkowego. Dla detekcji wbudowanych cząsteczek zastosowano przeciwciało anti-BrdU.

BrdU podawano myszokoczkom mongolskim dootrzewnowo w roztworze soli fizjologicznej (0.9% roztwór NaCl) z dodatkiem 0.07% NaOH zgodnie z podanymi niżej protokołami:

- w części doświadczeń zwierzęta otrzymywały jednorazowe iniekcje znacznika w dawce 50 mg/kg masy ciała 24 godziny przed pobraniem materiału do analizy. Tę procedurę stosowano w celu określenia dynamiki wbudowania BrdU w różnych sekwencjach czasu po niedokrwieniu (6-28 dni)
- w pozostałych doświadczeniach zwierzęta otrzymywały iniekcje BrdU dwa razy dziennie, każdorazowo 50 mg/kg masy ciała przez 3 kolejne dni, począwszy od 6 dnia po indukcji niedokrwienia. Materiał do analizy pobierano po 7, 14 i 28 dniach po przywróceniu krążenia. Taki sposób postępowania pozwalał na określenie fenotypu komórek wbudowujących znacznik.

3. 2. 3. Pobranie materiału do badań

W zależności od charakteru planowanych analiz zwierzęta dekapitowano po uprzedniej perfuzji lub z jej pominięciem. Myszokoczki przeznaczone do badania endogennej neurogenezy były usypiane Vetbutalem i perfundowane przez serce początkowo buforowaną solą fizjologiczną (PBS, 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄ pH 7.5, 100 mM NaCl) schłodzoną do temperatury 4°C a następnie buforowanym 4% roztworem paraformaldehydu (PFA; SIGMA). Po zakończeniu perfuzji zwierzęta dekapitowano i wyizolowane mózgi dodatkowo utrwalano przez 3 godziny w 4% PFA w temperaturze 4°C. Utrwaloną tkankę poddawano krioprotekcji przez 12 godzin w 20% roztworze sacharozy w 0,1 M PBS w 4°C. Tak przygotowany materiał mrożono w suchym lodzie i przechowywano w temperaturze -70°C do czasu dalszego postępowania eksperymentalnego.

Bezpośrednio przed wykonaniem skrawków zamrożone mózgi były przenoszone do kriostatu, doprowadzane do temperatury -20°C i krojone w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 25 µm. Pływające skrawki przechowywano w temp. -20°C w buforze zapobiegającym zamrożeniu tkanki (0,01 M NaH₂PO₄, 0,04 M Na₂HPO₄, 30% glikol etylenowy, 30% gliceryna).

Zwierzęta przeznaczone do badań aktywności metaloproteinaz metodą zymografii *in situ* oraz do badań immunochemicznych metodą Western Blottingu były dekapitowane z pominięciem perfuzji. Dla określenia aktywności metaloproteinaz wyizolowane mózgi mrożono natychmiast na suchym lodzie i przechowywano w temp. -70°C do czasu przygotowania skrawków. Pocięte na kriostacie skrawki umieszczano na odtłuszczonych szkiełkach podstawowych pokrytych 2% roztworem silanu (SIGMA) w acetonie (Eurochem) i poddawano dalszej analizie.

Do badań immunochemicznych pobrane mózgi chłodzono w roztworze soli fizjologicznej, a następnie izolowano z nich hipokampy. Hipokampy dzielono pod binokulem wzdłuż szczeliny (*fissura*) na fragment grzbietowy zawierający wrażliwe na niedokrwienie komórki rejonu CA1 oraz oporną na uszkodzenie niedokrwienne część brzuszna z zakrętem zębatym i strukturami CA2-4. Wszystkie czynności wykonywano w temperaturze 0-4°C. Wyizolowane struktury mrożono natychmiast w suchym lodzie i do momentu wykonania oznaczeń przechowywano w temperaturze -70°C.

3. 2. 4. Analiza immunohistochemiczna

W celu określenia stopnia proliferacji progenitorów i identyfikacji fenotypu komórek wykonano szereg reakcji immunohistochemicznych stosując znaczniki specyficzne dla określonych fenotypów komórek neuralnych. Ocenę stopnia proliferacji komórek progenitorowych przeprowadzono na podstawie reakcji z monoklonalnym szczurzym przeciwciałem anti-BrdU. Fenotyp komórek neuralnych w hipokampie mózgu określano w oparciu o identyfikację białek ulegających ekspresji w młodych lub dojrzałych komórkach neuronalnych (NF200 i NeuN) oraz w astrocytach (GFAP). Listę stosowanych przeciwciał pierwszorzędowych zamieszczono w tabeli (Tabela nr 1).

Przed wykonaniem reakcji przygotowane skrawki mózgu płukano roztworem PBS (3 x 5 min., temp. 20°C). Dla detekcji komórek BrdU-pozytywnych inkubowano skrawki w 2 M HCl (60 minut, temp. 37°C) w celu denaturacji DNA. Kwaśne środowisko równoważono przy pomocy 0,1 M buforu boranowego (0,2 M kwas borny, 0,05 M boraks, pH 8,4) (3 x 5 min., temp. 20°C) i płukano ponownie w PBS (3 x 5 min., temp. 20°C).

Niespecyficzne wiązanie przeciwciał blokowano permeabilizując równocześnie błony komórkowe przez inkubację (1 godz. w temp. 20°C) w 10% surowicy krwi koziej (Gibco) w PBS (pH 7,4) zawierającej 0.5% Tritonu X 100. Skrawki mózgu inkubowano (12 godz. w temp. 4°C) z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi rozcieńczonymi w PBS. W celu immunodetekcji dwóch antygenów na tym samym preparacie inkubację z kolejnym przeciwciałem pierwszorzędowym prowadzono przez 1 godzinę w temp. 20°C.

Dla rozwinięcia reakcji barwnych skrawki inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z fluorochromami przez 1 godz. w temperaturze pokojowej w komorze bez dostępu światła. Rodzaj stosowanych przeciwciał drugorzędowych podano w formie tabeli (Tabela nr 2). Nadmiar czynnika blokującego jak i stosowanych przeciwciał, usuwano przez kolejne płukania (3 x 5 minut w PBS). Jądra komórek barwiono 5 µM roztworem Hoechst 33258 (Sigma) w PBS (pH 7,4) w temp. 20°C przez 30 min. Po odpłukaniu niezwiązanego barwnika (3 x 5 min. w PBS) preparaty przenoszono na szkiełka podstawowe i zamykano przy użyciu medium - Fluorescent Mounting Medium (Dako), które zapobiegało wygaszaniu emitowanej fluorescencji. Dla kontroli specyficzności reakcji immunohistochemicznych stosowano te same procedury z pominięciem przeciwciała pierwszorzędowego. Do momentu

analizy preparaty przechowywano w zaciemnionych pojemnikach w temperaturze 4°C.

Fenotyp	Przeciwciała (gospodarz)	Producent	Rozcieńczenie (izotyp)
Komórki proliferujące	Monoklonalne anti- BrdU (szczur)	Serotec	1:200 (IgG2a)
Komórki proliferujące	Monoklonalne anti- Ki67 (mysz)	Novocastra	1:100 (IgG1)
Młode neurony	Monoklonalne anti- NF200 (mysz)	Sigma	1:500 (IgG1)
Młode neurony	Monoklonalne anti- Tuj1 (mysz)	Covance	1:750 (IgG2a)
Dojrzałe neurony	Monoklonalne anti- NeuN (mysz)	Chemicon	1:500 (IgG1)
Dojrzałe neurony	Monoklonalne anti- MAP2 (mysz)	Sigma	1:500 (IgG1)
Astrocyty, neuralne komórki macierzyste	Poliklonalne anti- GFAP (królik)	Dako	1:1000 (IgG(H+L))
Astrocyty	Poliklonalne anti- S100β (królik)	Swant	1:1000 (IgG(H+L))
Oligodendrocyty	Monoklonalne anti- GALC (mysz)	Chemicon	1:200 (IgG3)

Tabela 1. Przeciwciała pierwszorzędowe użyte w badaniach immunocyto- i -histochemicznych.

Przeciwciała	Fluorochrom	Producent	Rozcieńczenie (Izotyp)
Anty-szczurze	FITC	Bethyl	1:1000 (IgG2a)
Anty-mysie	Alexa Fluor 546	Invitrogen	1:500 (IgG1)
Anty-mysie	Alexa Fluor 546	Invitrogen	1:500 (IgG3)
Anty-mysie	Alexa Fluor 488	Invitrogen	1:500 (IgG1)
Anty-królicze	Alexa Fluor 546	Invitrogen	1:500 (IgG(H+L))

Tabela 2. Przeciwciała drugorzędowe użyte w badaniach immunocyto- i -histochemicznych.

3. 2. 5. Oznaczenie aktywności metaloproteinaz (MMP-2 i MMP-9) metodą zymografii *in situ*

Aktywność metaloproteinaz (żelatynaz) MMP-2 i MMP-9 określano metodą zymografii *in situ*, opartej na zdolności obu form enzymatycznych do proteolizy żelatyny. Zamrożone skrawki mózgow myszokoczka mongolskiego płukano 3 x 5 min. w PBS, a następnie inkubowano z żelatyną skoniugowaną z FITC, rozcieńczoną w buforze aktywującym o składzie: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM, NaN₃ 0,02%. Końcowe stężenie substratu wynosiło 50 µg/ml. Inkubację prowadzono przez 3h w 37°C w zaciemnionej wilgotnej komorze. Wykładnikiem aktywności MMP-2 i -9 była intensywność fluorescencji emitowanej proporcjonalnie do stopnia proteolizy substratu. Po inkubacji preparaty płukano w PBS (3 x 5 min., temp. 20°C), po czym utrwalano w buforowanym 4% roztworze PFA przez 20 min. w temp. 20°C. Nadmiar PFA usuwano przez ponowne płukanie preparatów w PBS (3 x 5 min., temp. 20°C). Następnie preparaty zamykano w medium Fluorescent Mounting (Dako), suszono przez 12 godz. w temp. pokojowej i przechowywano w zaciemnionych pojemnikach w temperaturze 4°C. W celu wykluczenia niespecyficznego fluorescencji niektóre preparaty inkubowano w obecności 1 mM roztworu 1,10-O-fenantroliny, inhibitora metaloproteinaz o szerokim spektrum działania. Preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym Axiovert 25 (Carl Zeiss) i w mikroskopie konfokalnym (Carl Zeiss). Wizualizację mikroskopową opisano w jednym z kolejnych podrozdziałów.

Fenotyp komórek prezentujących aktywność żelatynolityczną określono immunohistochemicznie. Po przeprowadzonej zymografii preparaty płukano w PBS (3 x 10 min.), inkubowano w mieszaninie blokującej (10% surowica kozia + 0.5% Triton X 100), a następnie inkubowano przez noc w 4°C z przeciwciałami specyficznymi dla neuronów (NF200 i NeuN) lub astrocytów (GFAP). Jądra komórek wybarwiano odczynnikami Hoechst 33258, zgodnie z opisem zamieszczonym w podrozdziale 3.2.4.

3. 2. 6. Analiza ekspresji białka metodą Western blot

3.2.6.1. Przygotowanie prób i pomiar stężenia białka

Fragmenty grzbietowy i brzuszny hipokampa zawieszano w 10-krotnej objętości buforu lizującego RIPA (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.1% dodecylsulfianu sodu - SDS, z dodatkiem inhibitorów fosfataz i proteaz – 1 mM ortovanadianu sodu, 5 µg/ml leupeptyny, 5 µg/ml aprotyniny, 5 µg/ml pepstatyny A, 0.1 mg/ml PMSF) i homogenizowano ręcznie przy pomocy szklano-teflonowego homogenizatora. Homogenaty inkubowano na lodzie przez 45 min. po czym wirowano przez 30 min. przy 11000 rpm w temp. 4°C. W nadsączach otrzymanych po wirowaniu oznaczano stężenie białka metodą Lowry (podrozdział 3.2.6.5). Ten sam sposób postępowania stosowano w przypadku komórek HUCB-NSC.

3.2.6.2. Elektroforeza SDS-PAGE białek

Przed elektroforezą próbki białka denaturowano przez 5 minut w temp. 100°C z barwnym buforem obciążającym o właściwościach redukujących (62,5 mM Tris-HCl o pH 6,8; 10% glicerol, 2% SDS, 1,5% β -merkaptotanol, 0,05% błękit bromofenolowy). Bufor dodawano w stosunku objętościowym 1:5 do roztworu białka. Jednowymiarową elektroforezę białek w układzie nieciągłym Laemmliego prowadzono w żelu poliakrylamidowym (4% żel zagęszczający i 7,5, 10 lub 12% żel rozdzielający w zależności od ruchliwości elektroforetycznej analizowanego białka) w buforze elektrodowym (25 mM TRIS, 192 mM glicyna z dodatkiem 0,5% SDS). Ilość całkowitego białka nakładanego do studzienek poliakrylamidowych określano po wstępnej analizie zależności sygnału chemiluminescencyjnego w funkcji ilości białka. Nakładano po 50 μ g białka, po czym rozdzielano je przy stałym napięciu prądu wynoszącym 180 V przez około 45 minut w aparacie do elektroforezy wertykalnej względem białek wzorcowych.

3.2.6.3. Przenoszenie białek na błonę nitrocelulozową – elektroblotting

Rozdzielone w wyniku elektroforezy białka przenoszono na membranę nitrocelulozową 0.45 μ m Hybond-Extra C (Amersham) w buforze do przenoszenia (transferu) o składzie: 25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glicyna, 20% metanol (Towbin i wsp. 1992). Żel i membranę umieszczano odpowiednio pomiędzy namoczonymi w buforze do przenoszenia bibułami Whatman 3 mm i porowatymi materiałami dociskającymi w kasetach aparatu do mokrego elektrotransferu. Czas przenoszenia przy stałym napięciu prądu 100 V i natężeniu nieprzekraczającym 300 mA wynosił 90 minut. Jakość rozdziału elektroforetycznego i przeniesienia białek oceniano wizualnie poprzez niespecyficzne, odwracalne barwienie membrany 1% roztworem czerwieni Ponceau S (Sigma) w 0.1% kwasie octowym oraz wybarwienie żeli błękitem Coomassie (Fluka). Zabarwione membrany odplukiwano wodą destylowaną, po czym przeniesione na membrany białka poddawane były analizie immunochemicznej.

3.2.6.4. Immunodetekcja białek

Immunodetekcję białek prowadzono ze specyficznymi przeciwciałami pierwszorzędowymi (zgodnie z protokołami podanymi przez producenta), zamieszczonymi w tabeli nr 3 a następnie z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (Tabela 4). Po transferze białek wolną powierzchnię błony blokowano roztworem 5% odtłuszczonego mleka w PBS-T (80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 pH 7.5, 100 mM NaCl) lub (w przypadku analizy białek ufosforylowanych) w 5% roztworze albuminy wołowej w TBS-T (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl) z dodatkiem 0,05% Tween 20 przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej lub 12 godz. w temp. 4°C. Nadmiar czynnika blokującego oraz stosowanych przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych usuwano przez kolejne płukania (3 x 5 min.) w PBS-T lub TBS-T. Inkubację z przeciwciałem pierwszorzędowym (swoistym względem danego antygeny), zawieszonym w PBS-T lub TBS-T, prowadzono przez noc

w temperaturze 4°C. Inkubację z przeciwciałem drugorzędowym zawieszonym w buforze z dodatkiem 2% mleka lub 2% albuminy wołowej prowadzono przez 2 godziny. Warunki reakcji z przeciwciałami przedstawiono w tabelach 3 i 4.

Dla uwidocznienia reakcji stosowano metodę wzmocnionej chemiluminescencji (ECL), czyli emisji światła towarzyszącej reakcji chemicznej, katalizowanej przez związane przeciwciała drugorzędowe. Korzystano z zestawu firmy Amersham (ECL™ Western blotting detection reagents and analysis system). Immunoreakcję przenoszono na kliszę Hyperfilm™-ECL (Amersham). Natężenie immunoreaktywności, będące wyznacznikiem poziomu badanego białka, określano densytometrycznie w zakresie liniowego przebiegu przy pomocy densytometru firmy LKB (Ultrascan XL) i programu GelScan.

Dla kontroli specyficzności immunoreakcji zastosowano identyczną procedurę z pominięciem przeciwciała pierwszorzędowego. Dla wyeliminowania ewentualnych błędów wynikających z niewłaściwej ilości nałożonego na żel białka oprócz analizy wizualnej błon wybarwionych czerwienią Ponceau przeprowadzano reakcję immunochemiczną z przeciwciałem skierowanym przeciwko β -aktynie.

Analizę densytometryczną przeprowadzono za pomocą oprogramowania LabScan 6.0 oraz ImageQuant TL.

3.2.6.5. Oznaczanie stężenia białka metodą Lowry

Próbki białka i wzorcowej albuminy surowicy bydlęcej – BSA (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ lub 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) przygotowano zgodnie z protokołem producenta odczynników. Mieszanina reakcyjna w końcowej objętości 460 μl zawierała: 2 μl białka, 8 μl wody, 50 μl odczynnika A (BIO-RAD) i 400 μl odczynnika B (BIO-RAD). Ilość barwnej soli kompleksowej proporcjonalnej do ilości białka mierzono po 15 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej wobec próby odniesienia (nie zawierającej białka) przy długości fali 750 nm korzystając ze spektrofotometru DU-65 (Beckman). Wartości absorbancji badanych próbek przeliczano względem krzywej standardowej BSA (krzywa zależności absorbancji od stężenia białka).

3. 3. Badania *in vitro*

3. 3. 1. Hodowla komórek linii HUCB-NSC

Neuralne komórki macierzyste pochodzące z ludzkiej krwi pępowinowej - HUCB-NSC (Buzanska i wsp. 2006) hodowano w pożywce DMEM/F12 z niską zawartością płodowej surowicy bydlęcej (2% FBS, Gibco), wzbogaconej insuliną, transferyną i selenianem sodu (ITS 1:100, Gibco) z dodatkiem antybiotyków (AAS 1:100, Sigma). Hodowlę prowadzono w inkubatorze zapewniającym warunki atmosferyczne określone jako standardowe (atmosfera powietrza z zawartością 5% CO₂, o wilgotności 95%, i temperaturze 37°C). Komórki HUCB-NSC hodowane w takiej pożywce rosną w postaci dwóch frakcji: komórek pływających

Przeciwciała (gospodarz)	Producent	Rozcieńczenie
Poliklonalne anty-FAK (królik)	Santa Cruz	1:100
Poliklonalne anty-fosfo-FAK (Tyr397) (królik)	Biosource	1:100
Monoklonalne anty-PYK2 (mysz)	Upstate	1:1000
Poliklonalne anty-fosfo-PYK2 (Tyr402) (królik)	Biosource	1:500
Poliklonalne anty-Akt (królik)	Cell Signalling	1:1000
Poliklonalne anty-fosfo-Akt (Ser473) (królik)	Cell Signalling	1:1000
Poliklonalne anty-JNK (królik)	Cell Signalling	1:1000
Poliklonalne anty-fosfo-JNK (Thr183/Tyr185) (królik)	Cell Signalling	1:1000
Monoklonalne anty-ERK1/2 (mysz)	Cell Signalling	1:1000
Poliklonalne anty-fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (królik)	Cell Signalling	1:1000
Monoklonalne anty-Src (mysie)	Millipore	8:1000
Monoklonalne anty-fosfo-Src (Tyr416) (mysz)	Millipore	1:1000
Poliklonalne anty-βAktyna	Sigma Aldrich	1:100

Tabela 3. Przeciwciała pierwszorzędowe użyte w badaniach immunochemicznych.

Przeciwciała	Producent	Rozcieńczenie
Anty-królicze	Sigma Aldrich	1:8000
Anty-mysie	Amersham Biosciences	1:4000

Tabela 4. Przeciwciała drugorzędowe użyte w badaniach immunochemicznych.

w toni (niezróżnicowanych) i przylegających do podłoża (częściowo zróżnicowanych ukierunkowanych progenitorów neuralnych). Pożywkę wymieniano dwa razy w tygodniu.

Komórki przylegające trypsynizowano (5 min., 37°C), a następnie wirowano przez 3 min. przy prędkości 1000 rpm. Skumulowane obie pule komórek wysiewano w gęstości 10⁴ komórek/cm² na płytki 24-dołkowe (NUNC) ze szkiełkami pokrytymi fibronektyną (10 µg/ml w PBS). Przed przeniesieniem komórek pokryte roztworem fibronektyny płytki inkubowano 12 godzin w temperaturze 4°C, po czym nadmiar substratu usuwano i płytki płukano roztworem PBS o temperaturze 30°C. Po uzyskaniu jednowarstwowo rosnącej hodowli komórek z medium inkubacyjnego wycofano surowicę. Dalszą hodowlę prowadzono w obecności /lub nieinhibitorów MMPs–SB-3CT, GM6001 lub doksycykliny. Część doświadczeń przeprowadzono w obecności inhibitora proteinaz serynowych - Pefabloku SC lub inhibitora furyn – Dec-RVKR-CMK. Steżone roztwory GM6001 (1 mM) i SB-3CT (50 mM) przygotowano w DMSO tak, aby końcowe stężenie DMSO nie wywierało efektu cytotoksycznego na hodowane komórki. Doksycyklinę i pozostałe inhibitory rozpuszczono w PBS. Stężenia stosowanych związków farmakologicznych podano w tabeli 5. Media hodowli kontrolnych zawierały odpowiednie rozpuszczalniki. Hodowlę komórek prowadzono przez 4, 8 lub 14 dni.

Inhibitor	Producent	Stężenie końcowe
GM6001 (inhibitor metaloproteinaz o szerokim spektrum)	Sigma-Aldrich	25 µM
Doksycyklina (nie-specyficzny inhibitor)	Sigma-Aldrich	60 µM
SB-3CT (specyficzny dla MMP-9 i MMP-2)	Sigma	10 µM
Pefablok SC (inhibitor proteinaz serynowych)	Roche	5 mM
Dec-RVKR-CMK (inhibitor furyn)	Calbiochem	50 µM

Tabela 5. Wykaz inhibitorów zastosowanych w hodowli komórek HUCB-NSC.

3. 3. 2. Dynamika wzrostu liczby komórek HUCB-NSC w hodowli

Komórki (w tej samej ilości) wysiewano na płytki pokryte fibronektyną. Po 4 i 8 dniach hodowli prowadzonej w obecności /lub bez inhibitorów medium hodowlane wymieniano na medium zawierające 10% Alamar Blue (Invitrogen). Po inkubacji (3 godz. w temperaturze 37°C) oznaczano poziom fluorescencji przy użyciu spektrofotometru (MultiScan Ascent FL LabSystems Oy, Helsinki) przy długości fali wzbudzenia 545 nm i emisji 590 nm. Poziom fluorescencji (proporcjonalny do liczby przeżywających komórek) w oparciu o sporządzoną

krzywą wzorcową był przełożony na liczbę żywych komórek HUCB-NSC w hodowli.

3. 3. 3. Analiza immunocytochemiczna

W celu określenia stopnia proliferacji oraz fenotypu komórek HUCB-NSC wykonano szereg reakcji immunocytochemicznych stosując przeciwciała pierwszorzędowe oraz odpowiednie przeciwciała drugorzędowe skoniugowane ze znacznikami fluorescencyjnymi (Tabela 1 i 2). W tym celu komórki HUCB-NSC utrwalano przez 20 min. w roztworze 4% PFA w PBS. Po odpłukaniu roztworu utrwalającego w PBS (3 x 5 min.) niespecyficzne wiązanie przeciwciał blokowano w opisaną wyżej mieszaninie blokującej i zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.2.4. komórki inkubowano z odnośnymi przeciwciałami, skierowanymi przeciwko antygenom niedojrzałych i dojrzałych neuronów (odpowiednio Tuj1, MAP2), antygenom oligodendrocytów (GALC) oraz astrocytów (S100 β) (Tabela 1). Proliferację komórek oceniano na podstawie reakcji z przeciwciałem anti-Ki67, znakującym komórki będące w cyklu mitotycznym.

3. 3. 4. Analiza różnicowania HUCB-NSCs

Neurony, astrocyty i oligodendrocyty zliczano manualnie. Liczbę komórek prezentujących specyficzny antygen wyrażano w % całkowitej ich ilości (w oparciu o liczbę wybarwionych jąder komórkowych). W typowym doświadczeniu liczono 5000 komórek prezentujących określony antygen.

3. 4. Wizualizacja mikroskopowa

Wyniki badań immunohistochemicznych i immunocytochemicznych oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym Axiovert 25 (CarlZeiss) poprzez wzbudzenie fluorescencji systemem filtrów odcinających wybrane spektrum długości fali, oraz w mikroskopie konfokalnym Zeiss LSM 510 wyposażonym w lasery i oprogramowanie ZEN. Dla wzbudzenia fluorescencji FITC korzystano z lasera argonowego 488 nm. Helowo-neonowy laser 543 nm służył do wzbudzenia fluorescencji Alexa Fluor 546, natomiast do wzbudzenia fluorescencji Hoechst używano lasera 405 nm. Obraz rejestrowano przy użyciu kamery cyfrowej CCD-4230. Dla dalszej analizy obrazu używano programów: Zeiss LSM Image Browser oraz ImageJ. Kontrast i nasycenie barw oraz kadrowanie zdjęć przeprowadzono w programie Corel Photo-Paint X4.

3. 5. Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki przedstawiono jako wartości średnie z szeregu doświadczeń, \pm SD (standardowy błąd średniej). Ilość powtórzeń zaznaczono w opisie rycin. W celu testowania statystycznej istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test wielokrotnych porównań (post hoc) Bonferroni. Do wszystkich obliczeń stosowano program Prism 3.0. Poziom istotności mniejszy niż 0.05 przyjęto za statystycznie znamienne.

4. WYNIKI

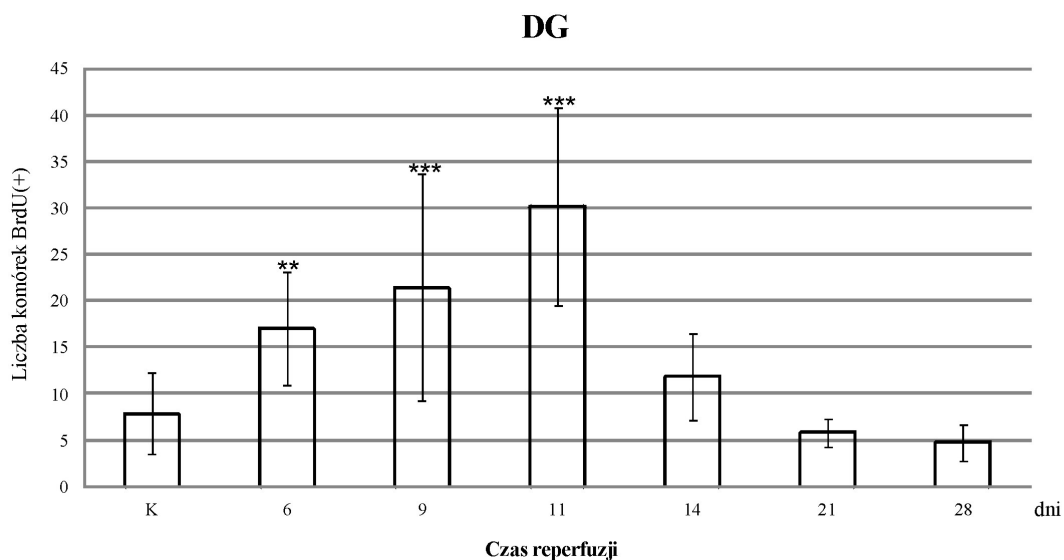
4. 1. Dynamika proliferacji komórek w hipokampie dorosłego myszokoczka mongolskiego po całkowitym niedokrwieniu przodomózgowia

Dynamikę proliferacji komórek w hipokampie dorosłego myszokoczka mongolskiego określano liczbą komórek wbudowujących do DNA bromodeoxyurydynę (BrdU) w czasie 24 godzin po jednej iniekcji znacznika. Dzielące się komórki identyfikowano na podstawie pozytywnej immunoreakcji ze specyficznym przeciwciałem skierowanym przeciw BrdU. Przedmiotem analizy były dwie struktury hipokampa: zakręt zębaty - DG i Róg Ammona - CA1. Liczbę wyznakowanych komórek liczono po 6, 9, 11, 14, 21 i 28 dniach od momentu niedokrwienia korzystając z programu komputerowego ImageJ. Otrzymane wyniki przedstawione w postaci wykresu (Ryc. 7) wskazują, że niewielka proliferacja komórek ma miejsce w hipokampie zwierząt kontrolnych (poddanych operacji pozorowanej). Niedokrwienie mózgu prowadzi do znaczącego wzrostu gęstości komórek BrdU-pozytywnych, przy czym charakter dynamiki proliferacji w badanych czasach reperfuzji zależy od danej struktury hipokampa. W zakręcie zębatym komórki dzielące się umiejscowione są głównie w strefie podziarnistej - SGZ i jest ich najwięcej po 9-11 dniach przywróconego krążenia (Ryc. 7 i 8) ($p < 0,001$). Przy wydłużonym czasie reperfuzji liczba tych komórek pozostaje na poziomie zbliżonym do kontroli.

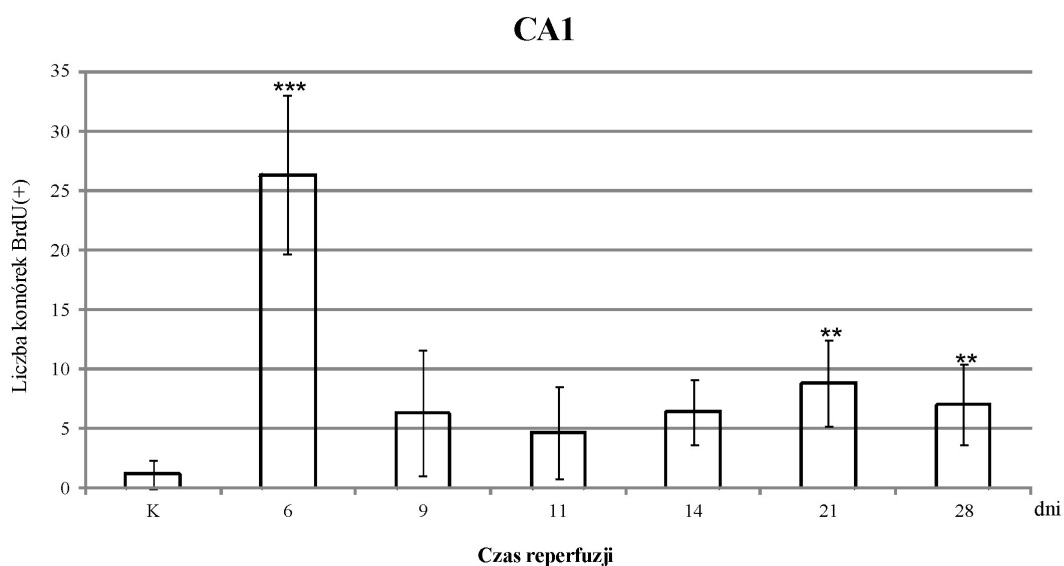
Niektóre komórki BrdU-pozytywne prezentują obecność neurofilamentu 200 już w czasie 24 godzin, to jest na wczesnym etapie rozwoju komórki (Ryc. 8, 9). Ekspresja tego białka może wskazywać na ukierunkowanie komórki do dalszego różnicowania. Wśród populacji komórek wyznakowanych BrdU niektóre z nich ujawniają obecność kwaśnego białka włókienkowego – GFAP. Ekspresja tego białka może być związana z progenitorami neuralnymi lub astrocytami.

Niedokrwienie mózgu stymuluje także proliferację komórek w rejonie CA1, szczególnie w 6 dniu reperfuzji ($p < 0,001$). Istotny w stosunku do kontroli wzrost liczby komórek wbudowujących BrdU obserwuje się także po 21 i 28 dniach reperfuzji ($p < 0,01$) (Ryc. 7). Zgodnie z przedstawionym obrazem immunohistochemicznym komórki poszczególnych struktur rejonu CA1 różnią się intensywnością znakowania. W uszkodzonej w wyniku niedokrwienia warstwie komórek piramidowych widoczne są jedynie nieliczne jądra BrdU-pozytywne, przy znaczącej ich liczbie notowanej w strukturach sąsiednich – warstwie początkowej i promienistej. Badania immunohistochemiczne ujawniły także istniejące różnice ekspresji antygenów. Podczas gdy ekspresja NF200 notowana jest jedynie we wrażliwej na niedokrwienie warstwie piramidowej, białko GFAP obecne jest w komórkach całego rejonu CA1 (Ryc. 9).

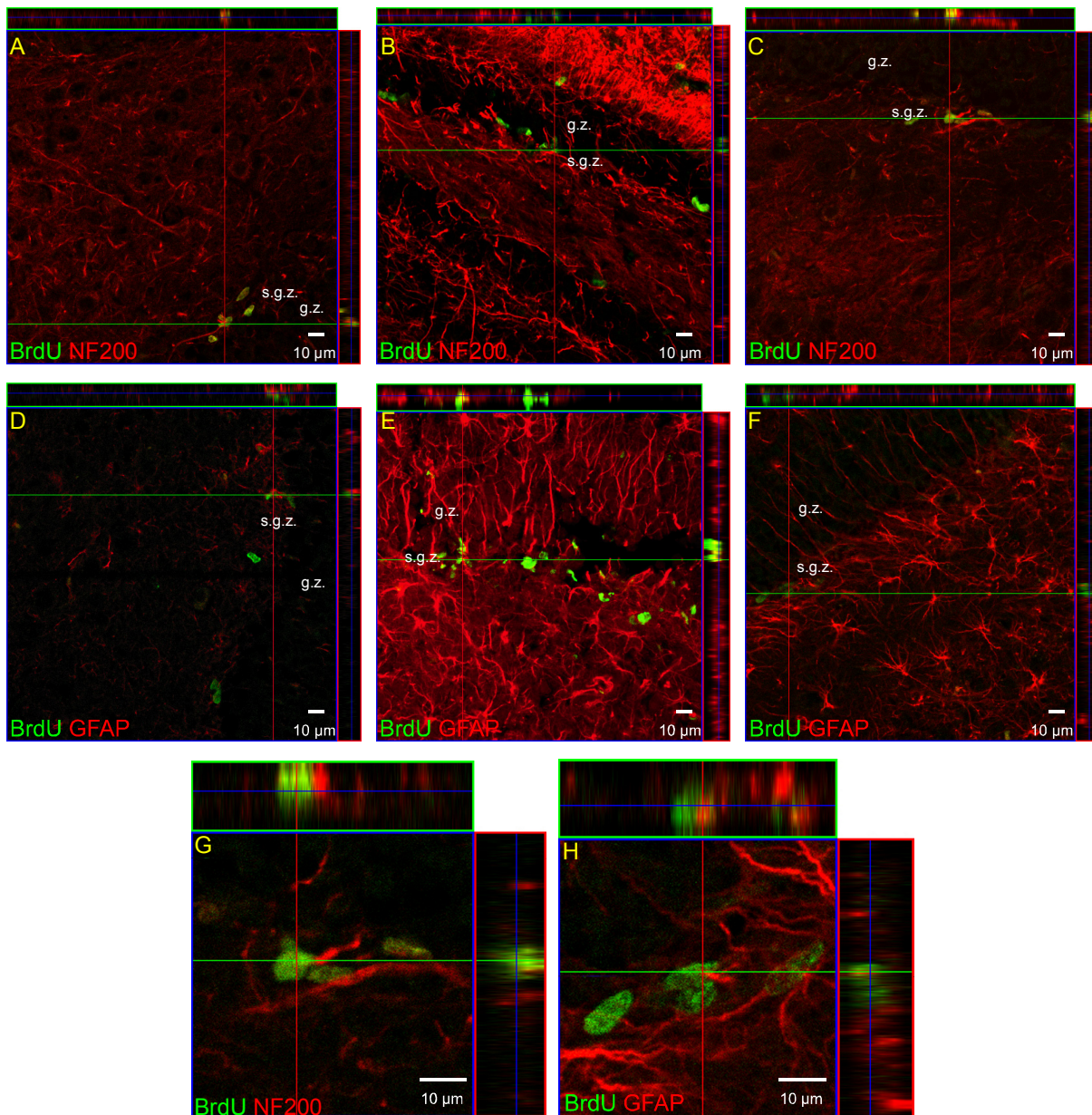
A



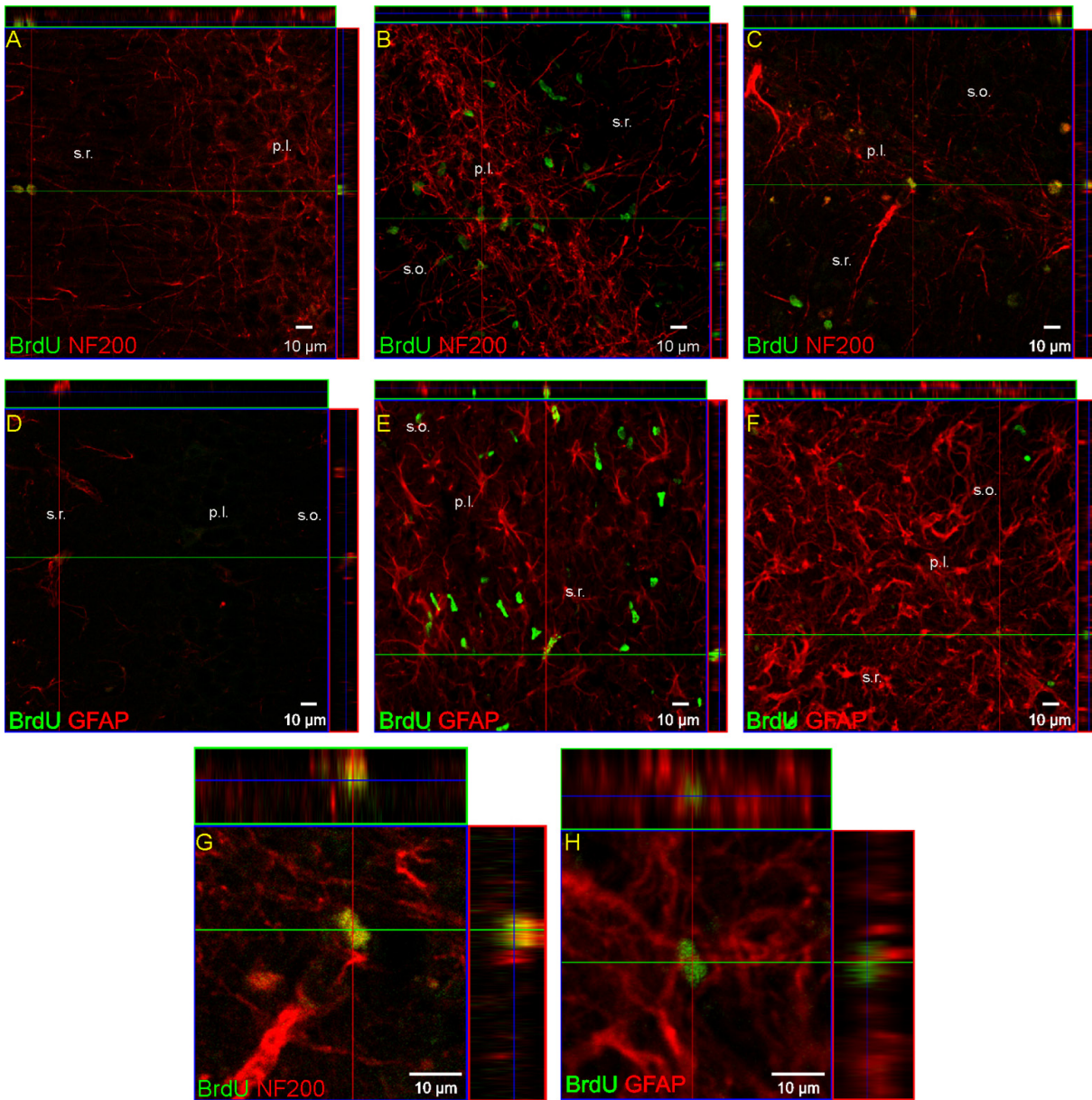
B



Rycina 7. Dynamika wbudowywania BrdU po niedokrwieniu/reperfuzji. Wykresy obrazują liczbę komórek BrdU(+) w SGZ zakrętu zębatego (A) oraz w CA1 (B) u zwierząt kontrolnych (K) oraz w różnych czasach reperfuzji. Każda wartość jest średnią z 6 zwierząt dla każdego punktu czasowego. ANOVA z testem post-hoc Bonferroni: ** $p < 0,01$ oraz *** $p < 0,001$ w stosunku do kontroli.



Rycina 8. Nowopowstające komórki w DG po niedokrwieniu/reperfuzji mózgu myszokoczka mongolskiego (n=6 dla każdego punktu czasowego). Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego obrazują podwójne barwienia histochemiczne z przeciwciałami: anti-BrdU (zielony) oraz anti-NF200 (czerwony) (A,B,C,G) lub anti-GFAP (czerwony) (D,E,F,H) w DG zwierząt kontrolnych (A,D), po 9 dniach reperfuzji (B,E) oraz po 28 dniach reperfuzji (C,F,G,H). Skala 10μm. Zastosowane skróty: s.g.z. – warstwa podziarnista (subgranular zone), g.z. – warstwa ziarnista (granular zone).



Rycina 9. Nowopowstałe komórki w CA1 po niedokrwieniu/reperfuzji mózgu myszokoczka mongolskiego (n=6 dla każdego punktu czasowego). Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego obrazują podwójne barwienia histochemiczne z przeciwciałami: anti-BrdU (zielony) oraz anti-NF200 (czerwony) (A,B,C,G) lub anti-GFAP (czerwony) (D,E,F,H) w CA1 zwierząt kontrolnych (A,D), po 6 dniach reperfuzji (B,E) oraz po 28 dniach reperfuzji (C,F,G,H). Skala 10µm. Zastosowane skróty: s.r. – warstwa promienista (*stratum radiatum*), p.l. – warstwa komórek piramidowych (pyramidal layer), s.o. – warstwa początkowa (*stratum oriens*).



4. 2. Fenotypowa charakterystyka komórek proliferujących w hipokampie dorosłego myszokoczka mongolskiego.

Badanie skłonności komórek BrdU-pozytywnych do różnicowania w określony fenotyp prowadzono w oparciu o analizę immunohistochemiczną, przy użyciu markerów typowych dla komórek neuronalnych – NF200 oraz NeuN oraz astrocytów – GFAP. Dla realizacji tego etapu badań BrdU podawano myszokoczkom 2 razy dziennie przez kolejne dni począwszy od 6-9 dnia po niedokrwieniu. Zwierzęta uśmiercano po 14 i 28 dniach reperfuzji (zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.2. W obu badanych punktach czasowych obserwuje się wzrost gęstości komórek BrdU-pozytywnych w zakręcie zębatym, najsilniej wyrażony w warstwie komórek podziarnistych po 28 dniach (Ryc. 10). Liczne komórki wykazują współbarwienie z NeuN – markerem dojrzałych neuronów. Wśród populacji komórek wyznakowanych BrdU widoczne są również komórki prezentujące białko neurofilamentu 200. Po 28 dniach reperfuzji komórki BrdU/NeuN-pozytywne są obecne także w warstwie komórek ziarnistych – GZ, co wskazuje na ich migrację z SGZ. Komórki wykazujące dodatnią podwójną immunoreakcję z przeciwciałami BrdU i NeuN można znaleźć także we wnętrzu (hilus).

W uszkodzonej warstwie piramidowej sektora CA1 liczba proliferujących komórek, szczególnie po 28 dniach reperfuzji, jest wyższa aniżeli w kontroli. Niektóre z nich prezentują pozytywne współbarwienie – BrdU i NF200. Nie stwierdzono natomiast ekspresji NeuN. W tym samym czasie widoczny jest wzrost gęstości komórek z wbudowanym BrdU w warstwach początkowej i promienistej. Znaczna ich liczba ekspresjonuje białko GFAP i posiada charakterystyczną dla astrocytów morfologię (Rycina 10).

4. 3. Wpływ niedokrwienia mózgu na aktywność metaloproteinaz - 2 i -9 w hipokampie dorosłego myszokoczka mongolskiego

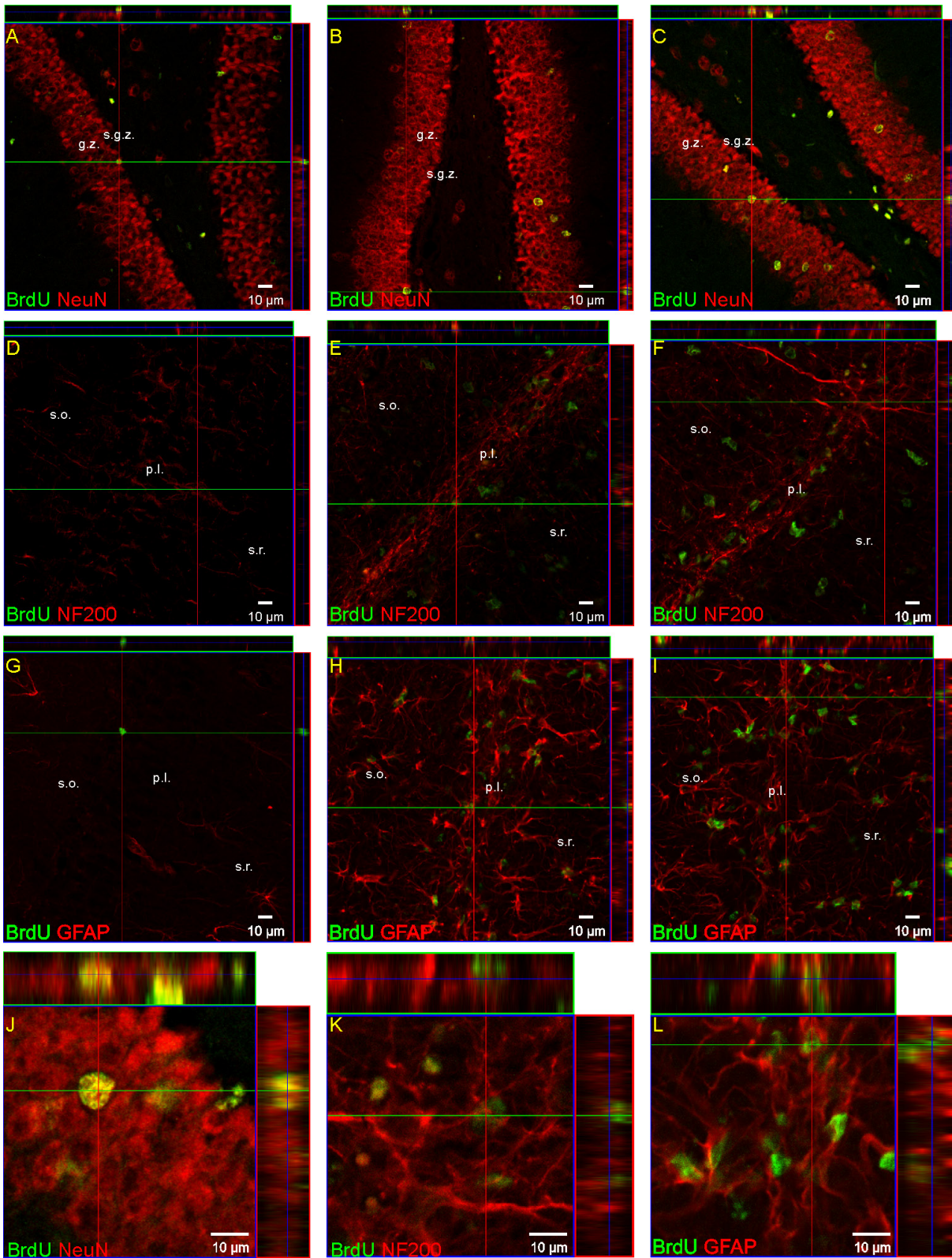
W związku z rozważaną w ostatnich latach hipotezą zakładającą potencjalną rolę metaloproteinaz w procesie neurogenezy postanowiono sprawdzić, czy stymulacja proliferacji i różnicowania progenitorów neuralnych po niedokrwieniu koreluje ze zmianami aktywności dwóch izoform metaloproteinaz z grupy żelatynaz – metaloproteinazy 2 i 9 (MMP-2 i MMP-9). Przedstawione na rycinie 11 wyniki oznaczeń wykonane metodą zymografii *in situ* obrazują różnice odpowiedzi badanych struktur hipokampa na niedokrwienie, manifestujące się poziomem intensywności sygnału fluorescencji. W zakręcie zębatym, równoległe z wydłużaniem czasu reperfuzji, obserwuje się wzrost aktywności MMPs w warstwie ziarnistej (GZ) oraz podziarnistej (SGZ). Aktywacja enzymów w tej strukturze koreluje czasowo i przestrzennie z etapami rozwoju komórek macierzystych.

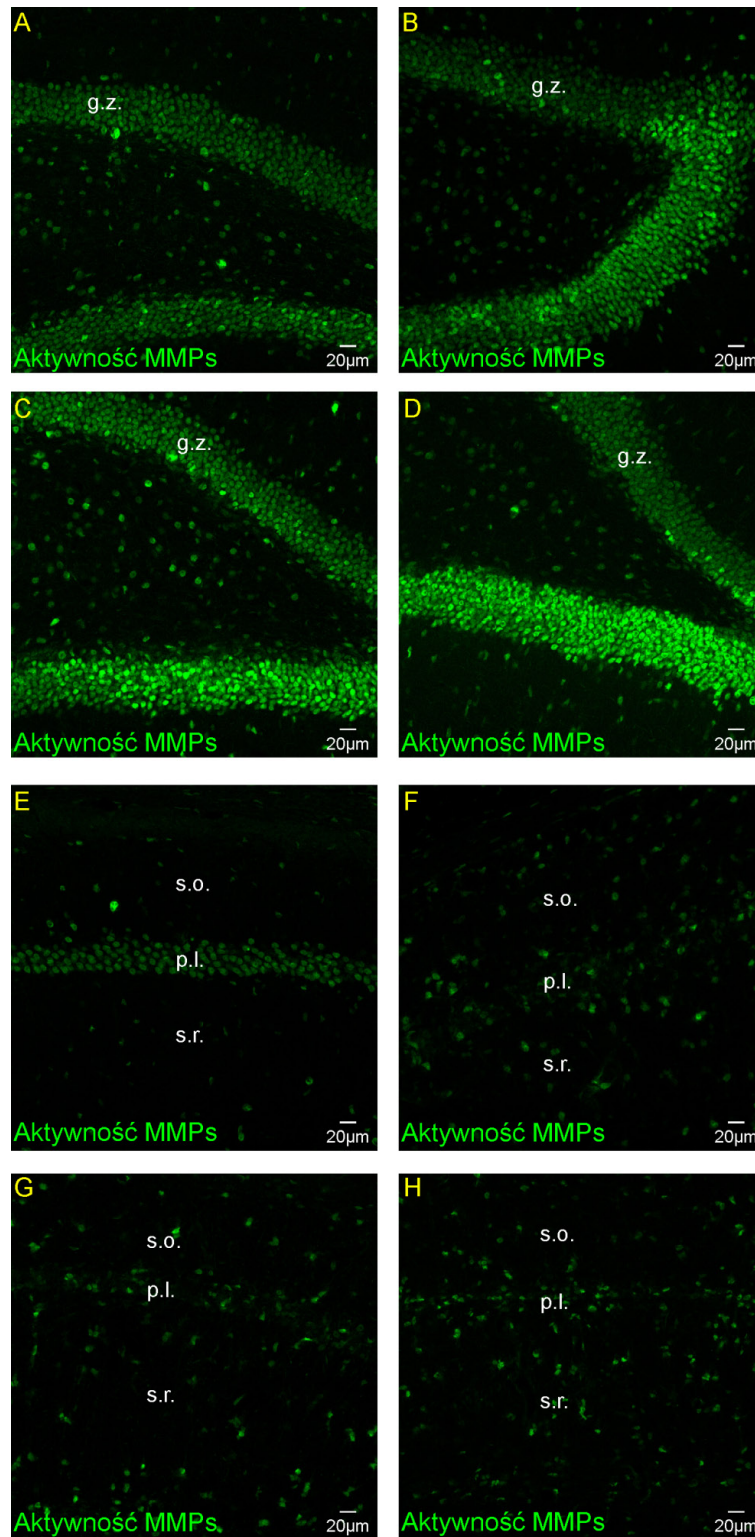
Bardziej złożony kierunek zmian prezentują struktury sektora CA1. Uszkodzeniu poniedokrwieniemu komórek warstwy piramidowej towarzyszy spadek aktywności

żelatynolitycznej poniżej poziomu charakterystycznego dla kontroli. W tym samym czasie reperfuzji notuje się wzrost aktywności MMPs w *stratum oriens* i *radiatum*. Dla określenia fenotypu komórek prezentujących aktywność proteolityczną zastosowano przeciwciała rozpoznające antygeny komórek neuronalnych – NF200 i NeuN oraz komórek astrogleju – GFAP.

Wyniki wykonanych reakcji immunohistochemicznych (Ryc. 12) wskazują, że w neurogennej strefie SGZ aktywność metaloproteinaz jest zlokalizowana w neuronach wykazujących ekspresję antygeny NF200 lub NeuN. W komórkach tych najmocniejszy sygnał fluorescencji widoczny był w ich jądrach. Podobną lokalizację aktywności zaobserwowano w sektorze CA1 z tą różnicą, że badane enzymy znaleźć można jedynie w pojedynczych komórkach NF200-pozytywnych. Wyraźny sygnał fluorescencyjny notuje się także w dojrzałych neuronach wnętrza zakrętu zębatego (*Hilus*). W s.o. oraz s.r. większość sygnału związanego z aktywnością MMPs pochodziła od komórek astrocytarnych (GFAP(+)) (Rycina 13). Tutaj też sygnał fluorescencji widoczny był głównie w cytoplazmie oraz na zewnątrz ciała komórki.

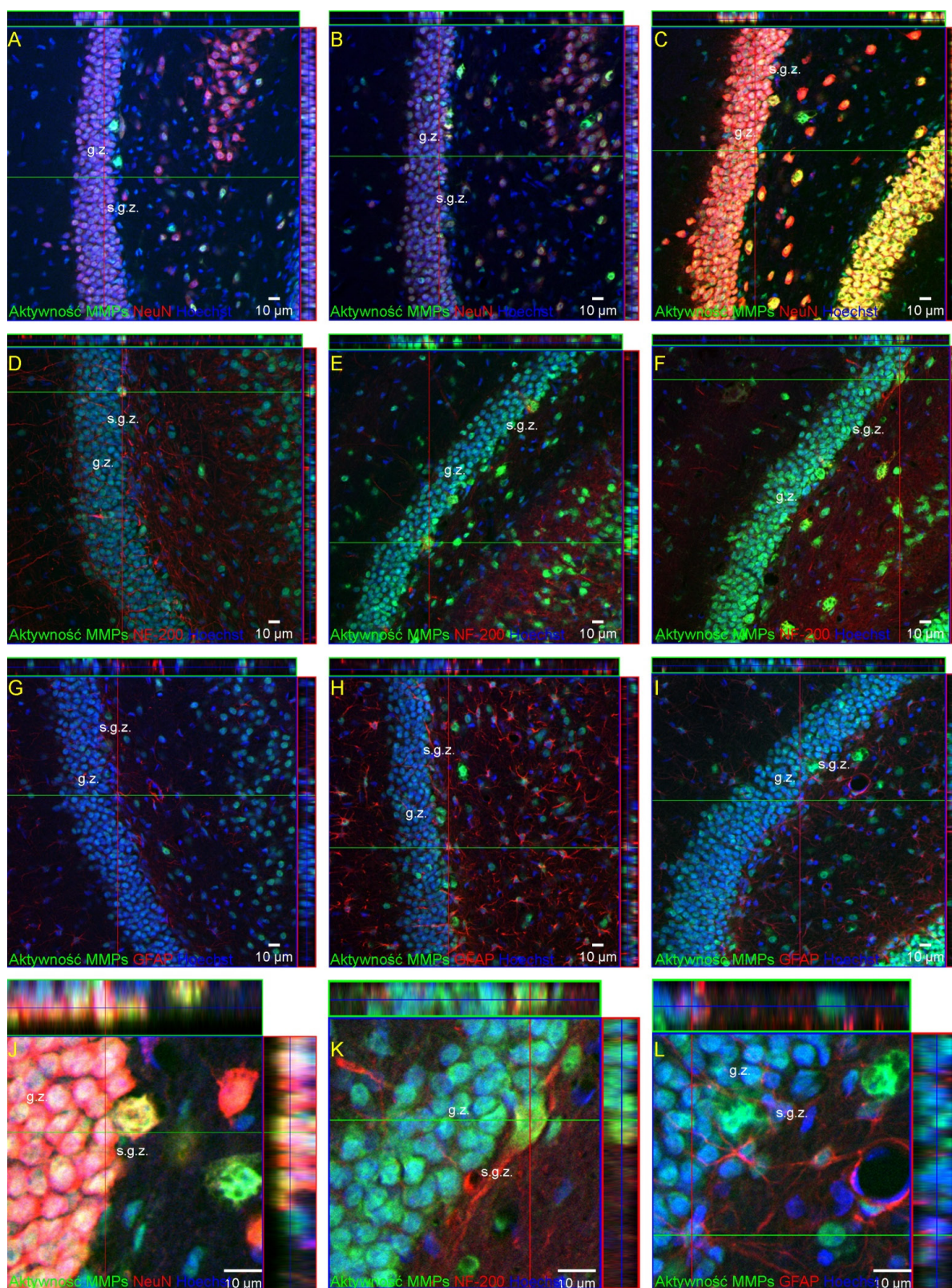
Rycina 10 (obok). Neurogeneza w hipokampie po niedokrwieniu/reperfuzji mózgu myszokoczka mongolskiego (n=6 dla każdego punktu czasowego). Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego obrazują podwójne barwienia histochemiczne z przeciwciałami: anty-BrdU (zielony) oraz anty-NeuN (czerwony) (A,B,C,J), anty-NF200 (czerwony) (D,E,F,K) lub anty-GFAP (czerwony) (G,H,I,L) w DG (A,B,C,J) oraz w CA1 (D-I,K,L) zwierząt kontrolnych (A,D,G), po 14 dniach reperfuzji (B,E,H) oraz po 28 dniach reperfuzji (C,F,I,J,K,L). Skala 10µm. Zastosowane skróty: s.g.z. – warstwa podziarnista (subgranular zone), g.z. – warstwa ziarnista (granular zone), s.r. – warstwa promienista (*stratum radiatum*), p.l. – warstwa komórek piramidowych (pyramidal layer), s.o. – warstwa początkowa (*stratum oriens*).



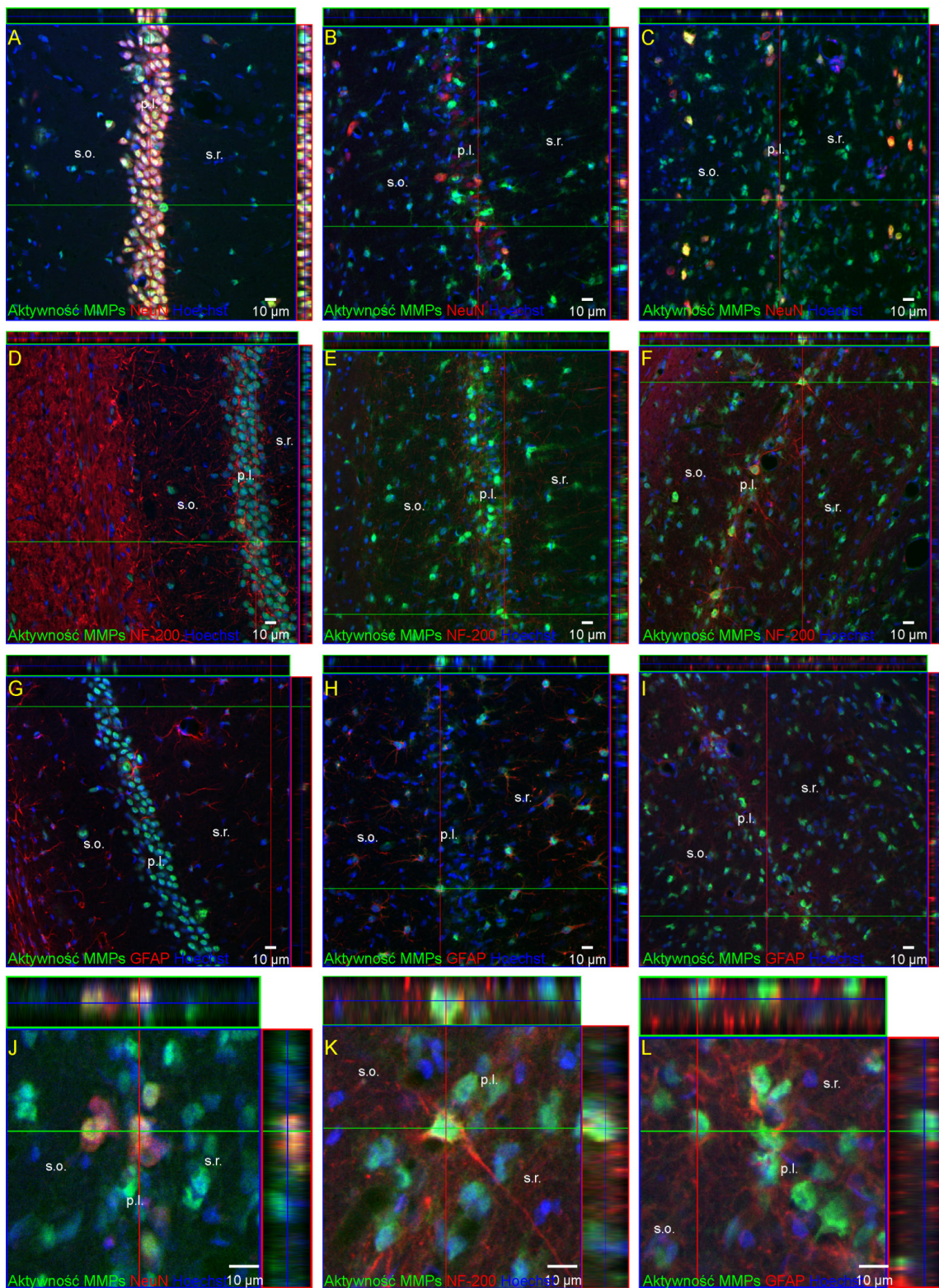


Rycina 11. Aktywność metaloproteinaz w hipokampie po niedokrwieniu/reperfuzji mózgu mysz-szczeczka mongolskiego (n=6 dla każdego punktu czasowego). Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego obrazują aktywność metaloproteinaz w DG (A,B,C,D) oraz w CA1(E,F,G,H) zwierząt kontrolnych (A,E), po 7 (B,F), 14 (C,G) oraz 28 (D,H) dniach reperfuzji. Skala 20µm. Zastosowane skróty: g.z. – warstwa ziarnista (granular zone), p.l. – warstwa komórek piramidowych (pyramidal layer), s.r. – warstwa promienista (*stratum radiatum*), s.o. – warstwa początkowa (*stratum oriens*).





Rycina 12. Lokalizacja aktywności metaloproteinaz w DG po niedokrwieniu/reperfuzji mózgu myszokoczcza mongolskiego (n=6 dla każdego punktu czasowego). Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego obrazują aktywność metaloproteinaz (zielony) w połączeniu z barwieniem histochemicznym (czerwony): NeuN (A,B,C,J), NF200 (D,E,F,K) oraz GFAP (G,H,I,L). Jądra komórkowe wybarwione odczynnikiem Hoechst (niebieski). DG zwierząt kontrolnych (A,D,G), po 7 (B,E,H) i 28 dniach reperfuzji (C,F,I,J,K,L). Skala 10μm. Zastosowane skróty: s.g.z. – warstwa podziarnista (subgranular zone), g.z. – warstwa ziarnista (granular zone).



Rycina 13. Lokalizacja aktywności metaloproteinaz w CA1 po niedokrwieniu/reperfuzji mózgu myszokoczka mongolskiego (n=6 dla każdego punktu czasowego). Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego obrazują aktywność metaloproteinaz (zielony) w połączeniu z barwieniem histochemicznym (czerwony): NeuN (A,B,C,J), NF200 (D,E,F,K) oraz GFAP (G,H,I,L). Jądra komórkowe wybarwione odczynnikiem Hoechst (niebieski). CA1 zwierząt kontrolnych (A,D,G), po 7 (B,E,H) i 28 dniach reperfuzji (C,F,I J,K,L). Skala 10μm. Zastosowane skróty: p.l. – warstwa komórek piramidowych (pyramidal layer), s.r. – warstwa promienista (*stratum radiatum*), s.o. – warstwa początkowa (*stratum oriens*).

4. 4. Wpływ inhibitorów MMP - SB-3CT, GM6001 i doksycykliny na rozwój komórek linii HUCB-NSC

Dla sprawdzenia hipotezy sugerującej udział metaloproteinaz w procesach związanych z neurogenezą zbadano wpływ ich inhibitorów na rozwój komórek neuralnych linii HUCB-NSC. W pierwszej części planowanych badań określano efekt obecności inhibitorów w pożywce hodowlanej na wzrost komórek i ich proliferację.

Wzrost i proliferacja komórek HUCB-NSC w obecności inhibitorów metaloproteinaz

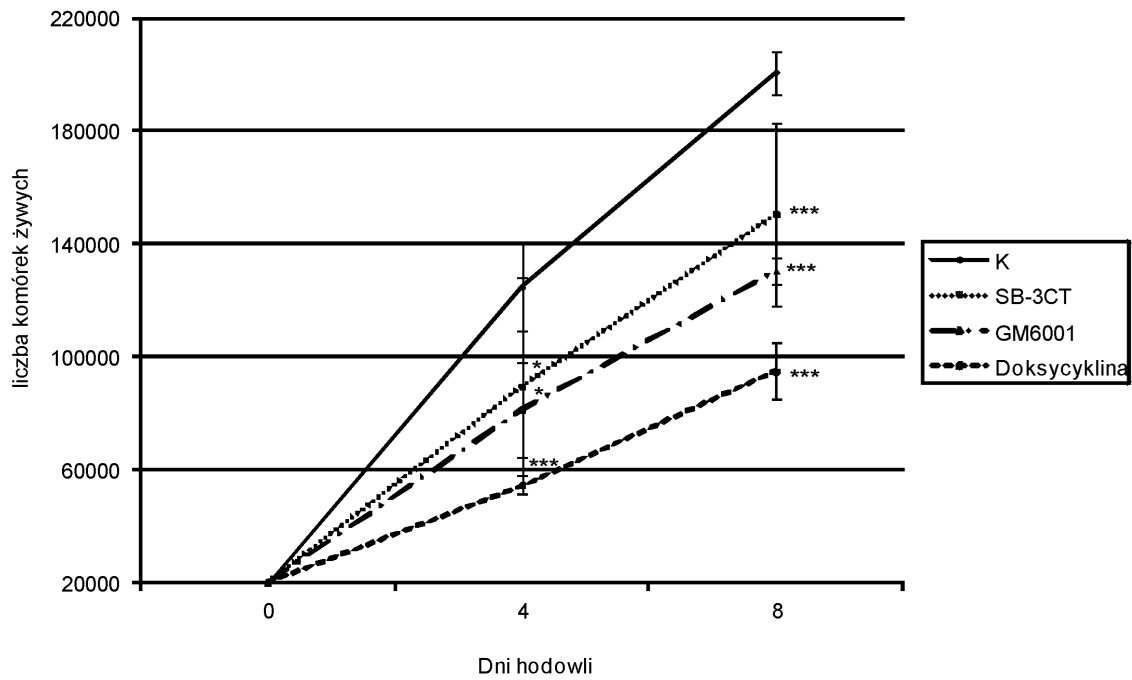
Rycina 14A przedstawia krzywe wzrostu komórek HUCB-NSC w medium bez/ i w obecności badanych związków farmakologicznych. W hodowlach kontrolnych obserwuje się intensywny, 10-krotny w stosunku do ich początkowej ilości, wzrost liczby komórek żywych w czasie 8 dni. Obecność inhibitorów metaloproteinaz: 10 μ M SB-3CT, 25 μ M GM6001 lub 60 μ M doksycykliny obniżała liczbę żywych komórek o około 30% w obecności SB-3CT i GM6001 i 60% w obecności doksycykliny. Pomimo znacznego obniżenia (w stosunku do kontroli) proporcji komórek przeżywających, krzywa wzrostu komórek prezentuje charakter liniowy.

Obecność inhibitorów metaloproteinaz w medium wpływa również na stopień proliferacji HUCB-NSC, oceniany liczbą komórek wykazujących obecność Ki67 - białka obecnego w jądrach komórek aktywnych mitotycznie. Wyniki przedstawione na rycinie 14B wskazują, że w obecności inhibitorów procent komórek Ki67-pozytywnych ulegał redukcji do 20-30% i 40-50% kontroli odpowiednio po 4 i 8 dniach hodowli. Wyraźny spadek liczby komórek dzielących się w wyniku traktowania hodowli inhibitorem SB-3CT ilustruje Ryc15.

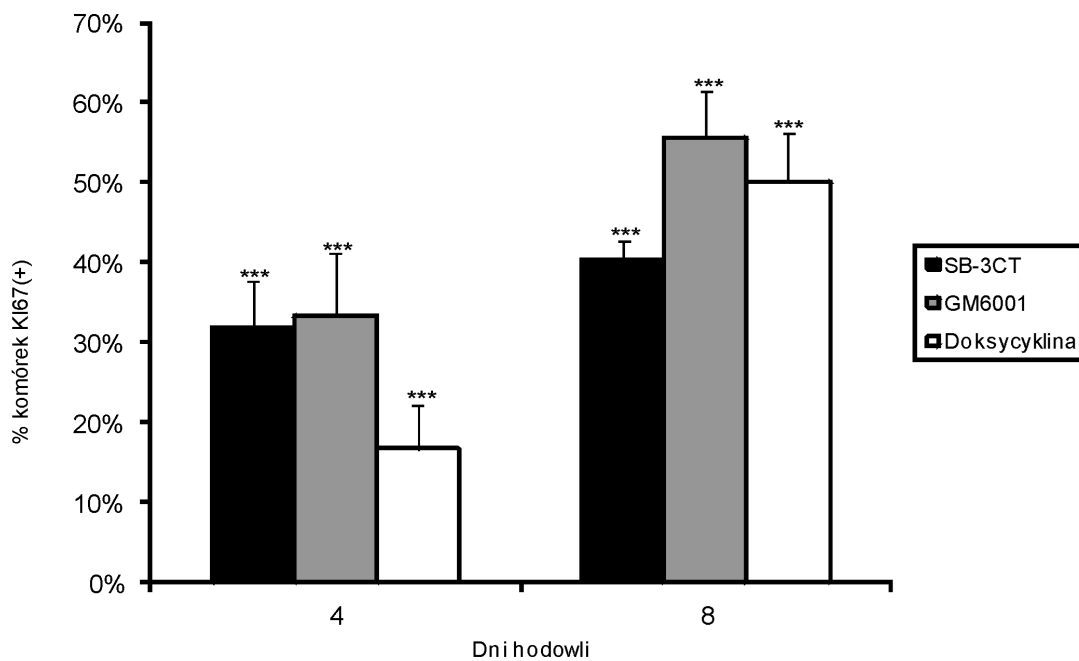
Różnicowanie komórek HUCB-NSC w obecności inhibitorów metaloproteinaz

Różnicowanie komórek HUCB-NSC hodowanych w pożywce standardowej (nie zawierającej inhibitorów), wykazało przewagę neurogenezy nad oligogenezą. Po 8 dniach hodowli około 32% całej populacji komórek wykazywało obecność Tuj1 – markera niedojrzałych neuronów, podczas gdy 17% zawierało białko MAP-2, które podlega ekspresji w neuronach dojrzałych. Wśród całej populacji obserwowano niewielką domieszkę komórek wykazujących ekspresję białek typowych dla zaawansowanych w różnicowaniu astrocytów (S100 β) i oligodendrocytów (GALC) – kształtującą się na poziomie odpowiednio 3 i 5%. (Ryc. 16). Wykonane dodatkowo oznaczenia aktywności MMPs w komórkach wykazały jej lokalizację we wszystkich badanych fenotypach neuralnych: w niedojrzałych i dojrzałych neuronach (Tuj1- i MAP2-pozytywnych), w astrocytach (S100 β +) i oligodendrocytach (GALC+) (Ryc. 17). Obserwacja ta mogła sugerować potencjalny udział metaloproteinaz w procesie różnicowaniu komórek HUCB-NSC. Dla sprawdzenia powyższego przypuszczenia hodowle komórek prowadzono w obecności inhibitorów metaloproteinaz określając ich wpływ na generowanie poszczególnych fenotypów - neuronalnych i glejowych. Przedstawione w postaci graficznej wyniki wskazują na zmianę profilu różnicowania w obecności badanych

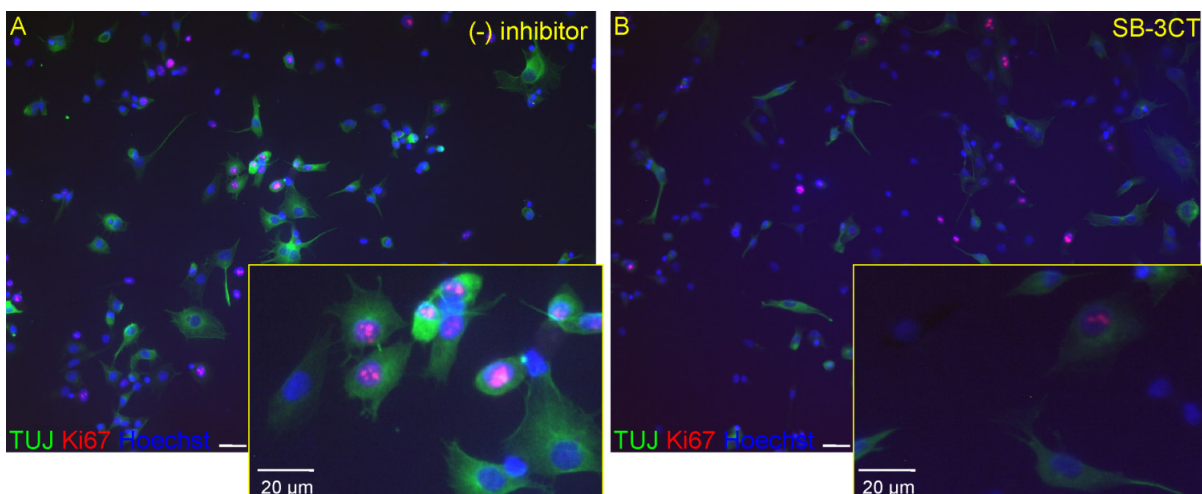
A



B



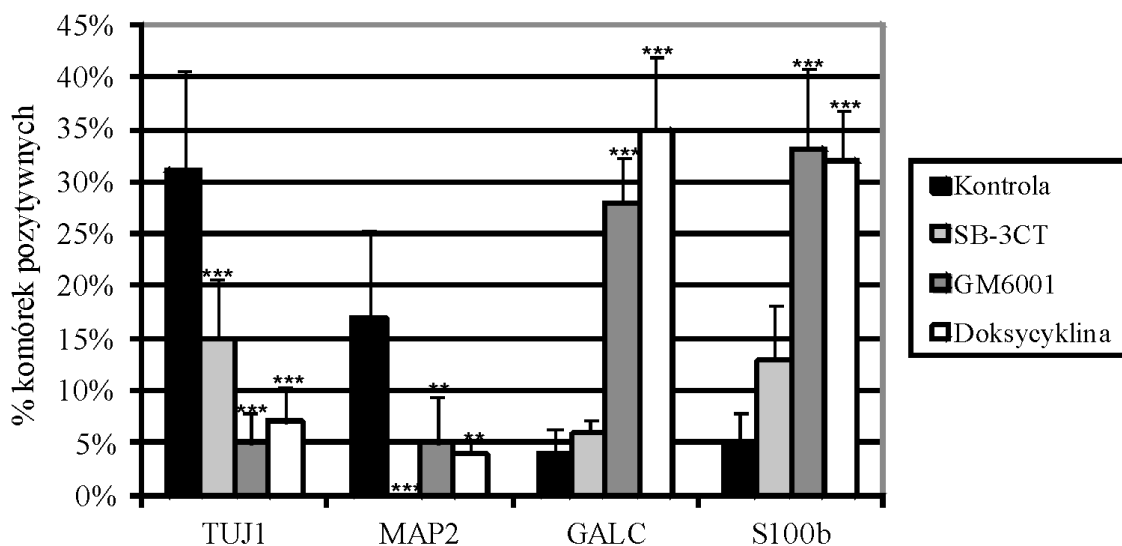
Rycina 14. Wpływ inhibitorów metaloproteinaz na wzrost i proliferację komórek HUCB-NSC.
A) Liczba komórek żywych hodowanych w pożywce bez inhibitora (kontrola-K) oraz w pożywce z inhibitorami metaloproteinaz: SB-3CT (10 μM), GM6001 (25 μM), doksycyklina (60 μM)
B) Odsetek komórek wyznakowanych Ki67 w obecności inhibitorów metaloproteinaz (w stosunku do przyjętej za 100% liczby komórek w hodowli kontrolnej). Każda wartość jest średnią (+/- SD) z pięciu niezależnych eksperymentów. ANOVA z testem post-hoc Bonferroni: *p<0,05, *p<0,001.**



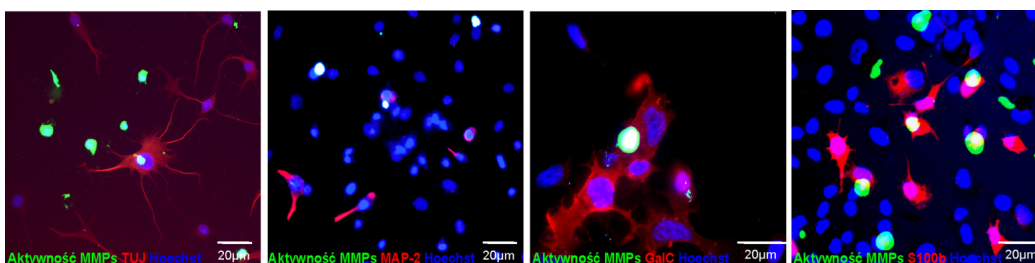
Rycina 15. Wpływ SB-3CT (10 μ M) na proliferację i różnicowanie komórek HUCB-NSC. Czas hodowli - 8dni. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego obrazują podwójne barwienie cytochemiczne z przeciwciałami: Ki67 (czerwony) oraz TuJ1 (zielony). Jądra komórkowe wybarwione odczynnikiem Hoechst 33258 (niebieski). Skala 20 μ m.

związków farmakologicznych, polegającą na inhibicji różnicowania HUCB-NSC w kierunku neuronów z równoczesnym promowaniem w kierunku powstawania oligodendrocytów i astrocytów (Ryc. 16). Proporcja niedojrzałych neuronów (TuJ1-pozytywnych) w porównaniu z kontrolą w obecności SB-3CT obniżona została do 15% (Ryc. 16) oraz do 5 i 7.5% w hodowlach traktowanych GM6001 i doksycykliną ($p < 0.001$). Inhibitory metaloproteinaz obniżały także proporcję obecnych neuronów dojrzałych (MAP2+). Najsilniejszy efekt obserwowano w obecności SB-3CT, który niemal kompletnie blokował powstawanie i dojrzewanie neuronów. W obecności doksycykliny i GM6001 $p = 0.003$, w obecności SB-3CT $p < 0.001$.

W tych samych warunkach notowano wyrażony w odsetkach wzrost komórek wykazujących ekspresję markerów typowych dla astrocytów i oligodendrocytów (S100 β i GALC). W obecności GM6001 i doksycykliny procent astrocytów wzrastał 6-, a oligodendrocytów 8-krotnie, w stosunku do kontroli (kontrola/inhibitory dla GALC i S100 β $p < 0.001$). Najsłabszy wpływ na ukierunkowanie różnicowania w kierunku komórek glejowych obserwowano w przypadku SB-3CT. W obecności tego inhibitora notowano jedynie 1.5-krotny w stosunku do kontroli wzrost proporcji komórek GALC-pozytywnych i 2.5-krotny komórek S100 β -pozytywnych. Wprowadzenie do pożywki hodowlanej inhibitora proteiny serynowej (Pefablok, 5 mM) lub inhibitora furyny (Dec-RVKR-CMK, 50 μ M) nie zmieniało opisanego dla kontroli profilu różnicowania HUCB-NSC.



Rycina 16. Wpływ inhibitorów metaloproteinaz na różnicowanie komórek HUCB-NSC. Hodowlę prowadzono przez 8 dni w medium zawierającym /lub nie inhibitorzy: SB-3CT (10 μ M), GM6001 (25 μ M), doksycyklinę (60 μ M). Wykres przedstawia odsetek komórek danego fenotypu w stosunku do całkowitej populacji komórek HUCB-NSC. Każda wartość jest średnią (+/- SD) z pięciu niezależnych eksperymentów. ANOVA z testem post-hoc Bonferroni: ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.



Rycina 17. Aktywność metaloproteinaz w hodowli komórek HUCB-NSC Czas hodowli – 8 dni. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego obrazują aktywność metaloproteinaz (zielony) w połączeniu z barwieniem cytochemicznym (czerwony) z zastosowaniem przeciwciał: Tuj1 (nieodjrzałe neurony), MAP2 (dojrzałe neurony), GALC (oligodendrocyty) i S100 β (astrocyty). Jądra komórkowe wybarwione odczynnikiem Hoechst 33258 (niebieski). Skala 20 μ m.

4. 5. Wpływ niedokrwienia mózgu na ekspresję i fosforylację/aktywację kinaz białkowych: FAK, PYK2, Src, ERK, JNK oraz Akt w hipokampie myszosczka mongolskiego

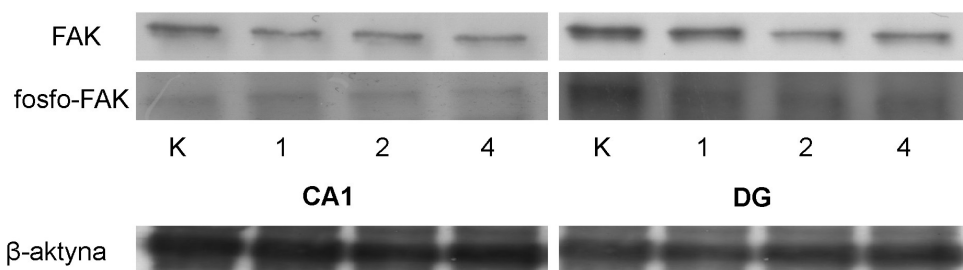
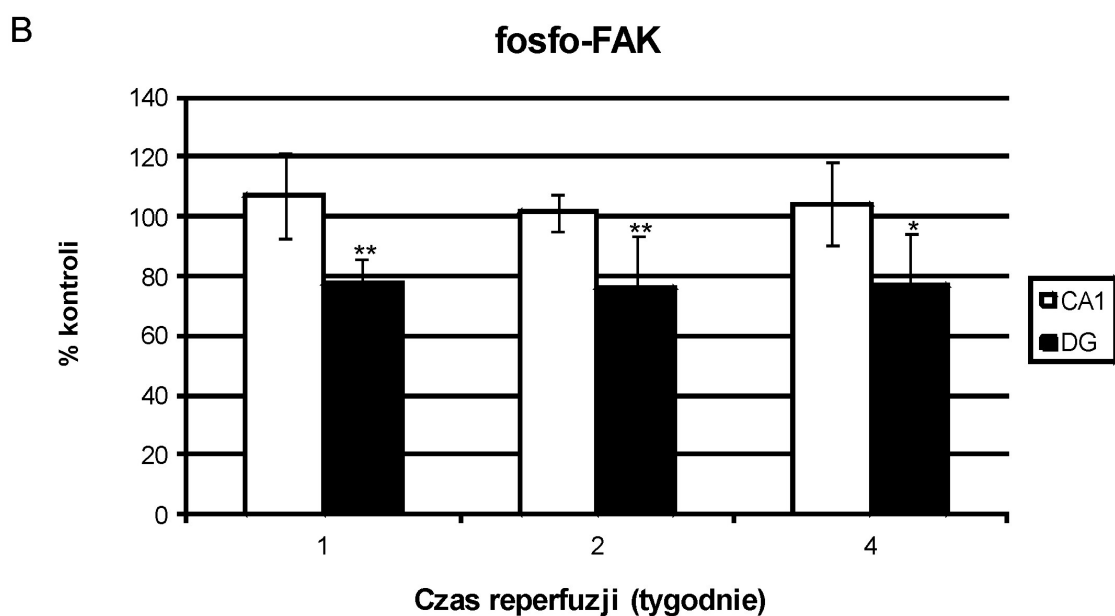
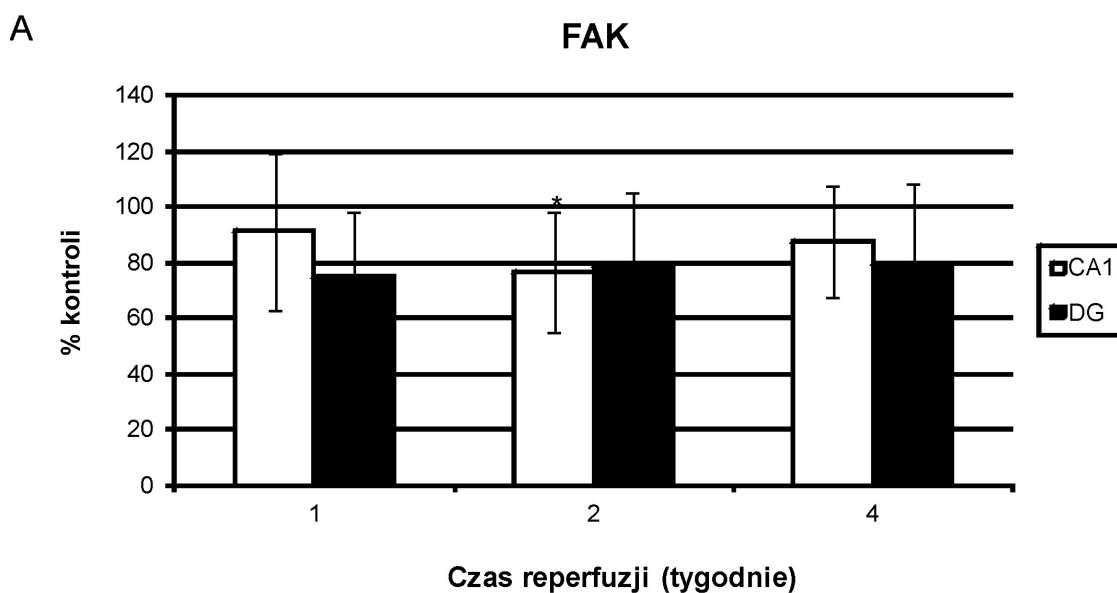
W tej części badań postanowiono sprawdzić czy stymulacja neurogenezy poniedokrwiennej w zakręcie zębatym i towarzyszący temu procesowi wzrost aktywności metaloproteinaz wpłynie na aktywność enzymów zaangażowanych w przekazywanie sygnału z ECM. Jak zaznaczono we wstępie rozprawy, pierwszymi odbiorcami informacji od integryn są niereceptorowe kinazy tyrozynowe – kinaza kontaktów adhezyjnych FAK i należąca do tej samej rodziny bogata w prolinę kinaza PYK2. Dalsze przekazanie sygnału polega na fosforylacji kolejnych białek efektorowych i stymulacji szlaku kinaz MAP i/lub szlaku kinazy PI3K/Akt. Według ogólnie przyjętego schematu warunkiem aktywności kinazy FAK jest ufosforylowanie reszty tyrozyny w pozycji 397 łańcucha polipeptydowego. Densytometryczna analiza wykonanych immunoblotów wskazuje na poniedokrwienne obniżenie poziomu fosfo-tyrozyny 397 do 80% wartości kontrolnej wyłącznie w neurogenym zakręcie zębatym hipokampa, przy braku zmian w części grzbietowej (Ryc. 17B).

Fosforylacja/aktywacja kinazy PYK2 także ulega redukcji (do 60% wartości kontrolnej) po 2 i 4 tygodniach reperfuzji. Spadek aktywności tej kinazy, inaczej aniżeli kinazy FAK, widoczny jest jedynie w fragmencie grzbietowym hipokampa (Ryc. 19B) Podobny charakter zmian prezentuje kinaza Src, która może być substratem kinazy PYK2 (Ryc. 23B).

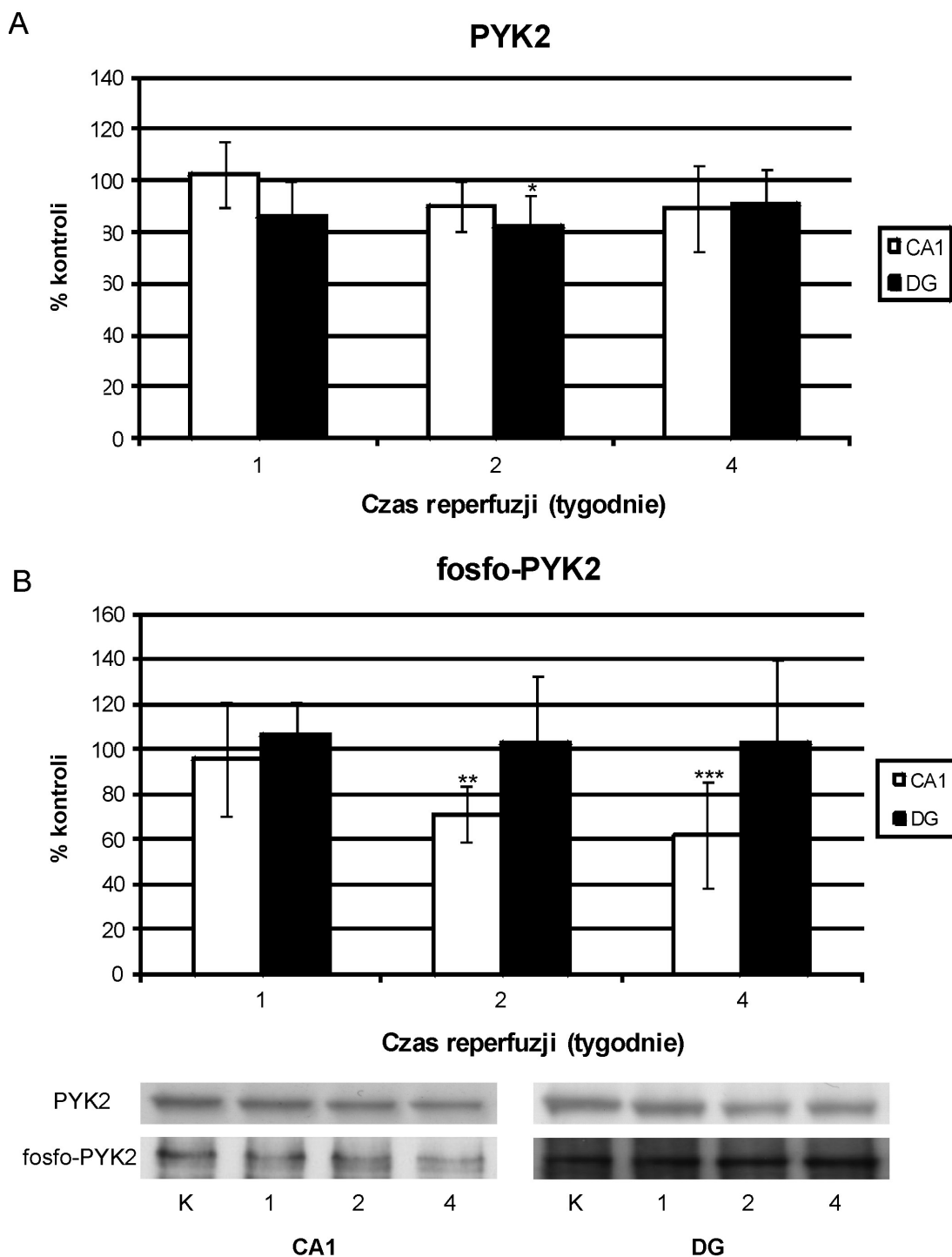
Kolejną kinazą reagującą zmianą poziomu fosforylacji po niedokrwieniu jest kinaza ERK. Dane zamieszczone na ryc 21 B przedstawiają względne wartości immunoreaktywności fosfo-Thr 202/204, przy czym obie formy kinazy ERK (p42 i p44) prezentują ten sam charakter zmian. Pogłębiająca się razem z wydłużeniem czasu reperfuzji redukcja fosforylacji kinazy ERK miała miejsce w obu fragmentach hipokampa – brzuszny i grzbietowy (odpowiednio do 75 i 48% kontroli po 4 tygodniach) (Ryc. 21B).

Aktywność pozostałych badanych kinaz, to jest kinazy Akt i kinazy JNK, przez cały czas reperfuzji pozostawała na poziomie charakterystycznym dla kontroli (Ryc. 20B i 22B).

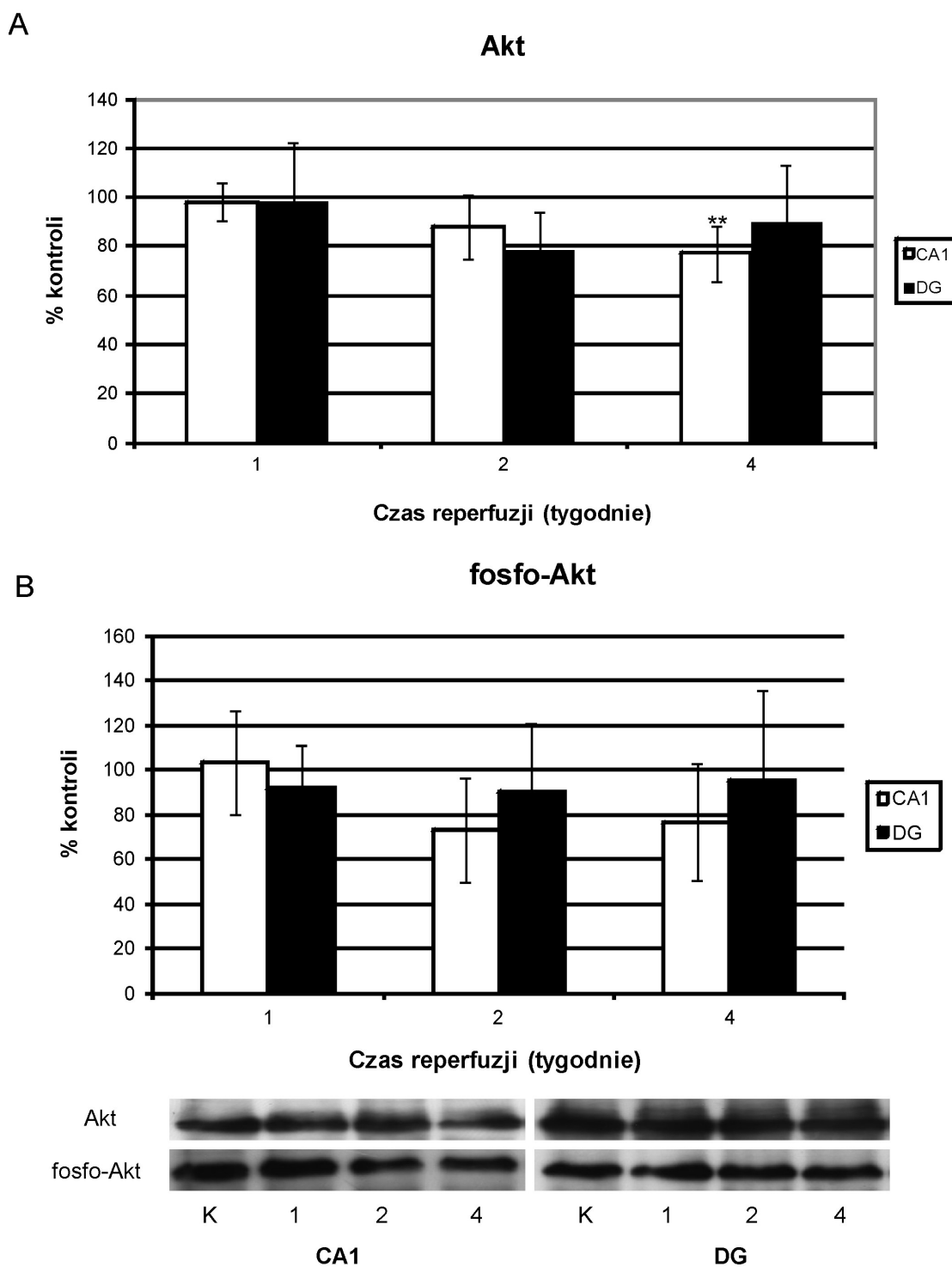
Zmianom aktywności badanych kinaz nie towarzyszyły zmiany immunoreaktywności odnośnych białek całkowitych. Notowane jest jedynie niewielkie obniżenie białka PYK2 w zakręcie zębatym (Ryc. 19A) jak i białka Akt we fragmencie grzbietowym (Ryc. 20A). W przypadku kinazy FAK można jedynie mówić o tendencji do obniżenia ekspresji tego białka (Ryc. 18A).



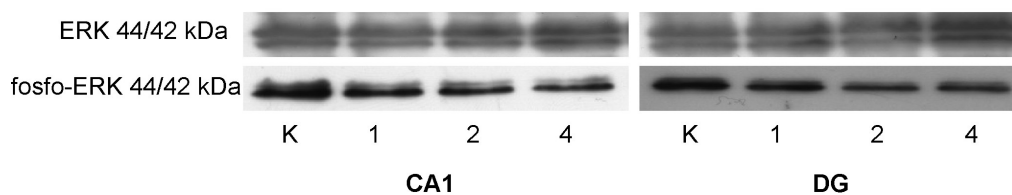
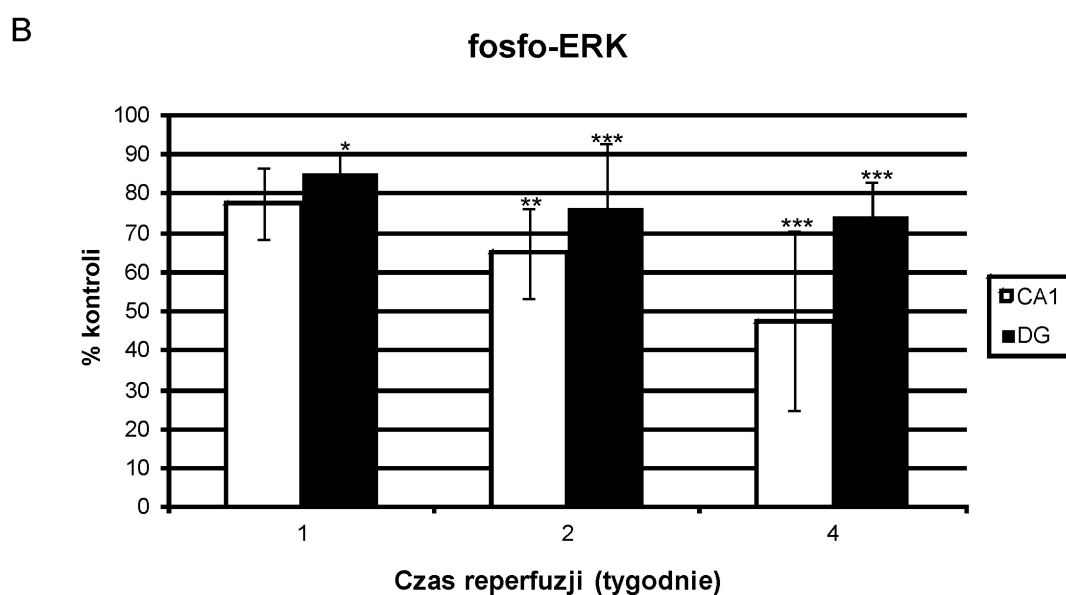
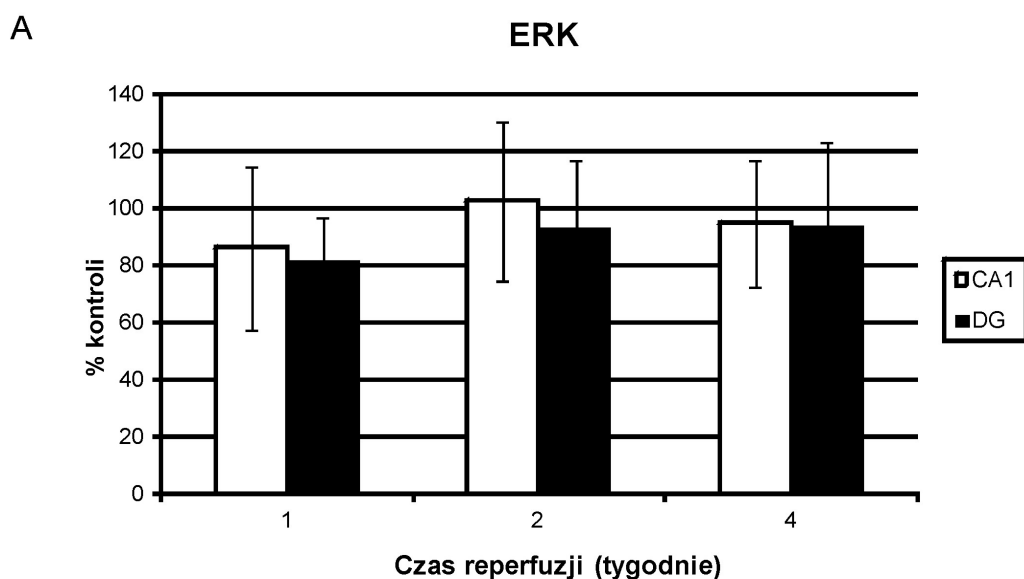
Rycina 18. Poziom białka FAK (A) i fosfo-FAK (B) w hipokampie myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu/reperfuzji. Wykresy przedstawiają względne poziomy kinazy FAK i jej formy ufosforylowanej na Tyr 397 (w stosunku do przyjętego za 100% poziomu białka w odnośnej części hipokampa zwierzęcia kontrolnego) uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Każda wartość jest średnią (+/- SD) uzyskaną z analizy hipokampów pięciu zwierząt, przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Test ANOVA z testem post hoc Bonferroni: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



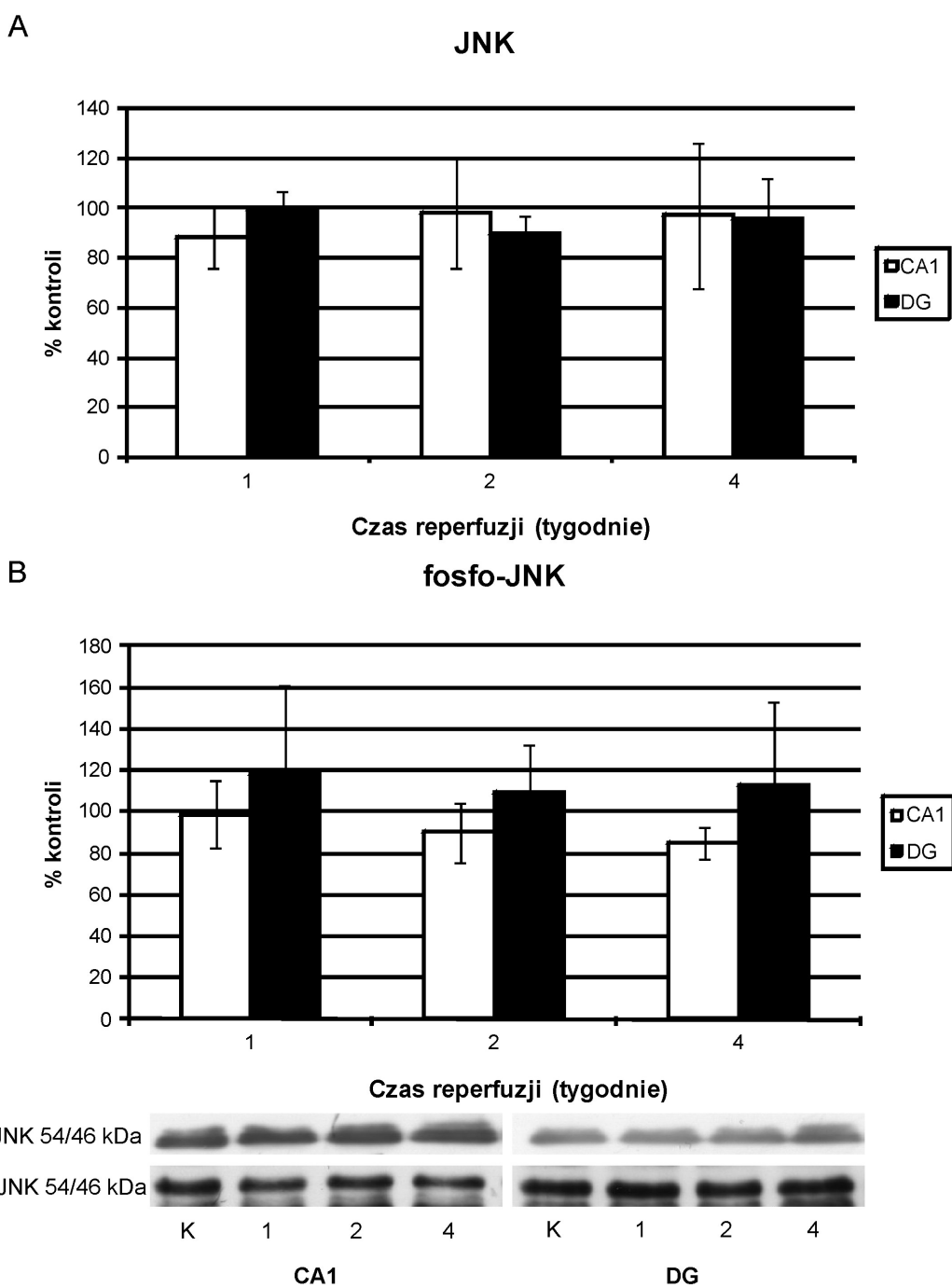
Rycina 19. Poziom białka PYK2 (A) i fosfo-PYK2 (B) w hipokampie myszokoczek mongolskiego po niedokrwieniu/reperfuzji. Wykresy przedstawiają względne poziomy kinazy PYK2 i jej formy ufosforylowanej na Tyr 402 (w stosunku do przyjętego za 100% poziomu białka w odnośnej części hipokampa zwierzęcia kontrolnego) uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Każda wartość jest średnią (+/- SD) uzyskaną z analizy hipokampów pięciu zwierząt, przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Test ANOVA z testem post hoc Bonferroni: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



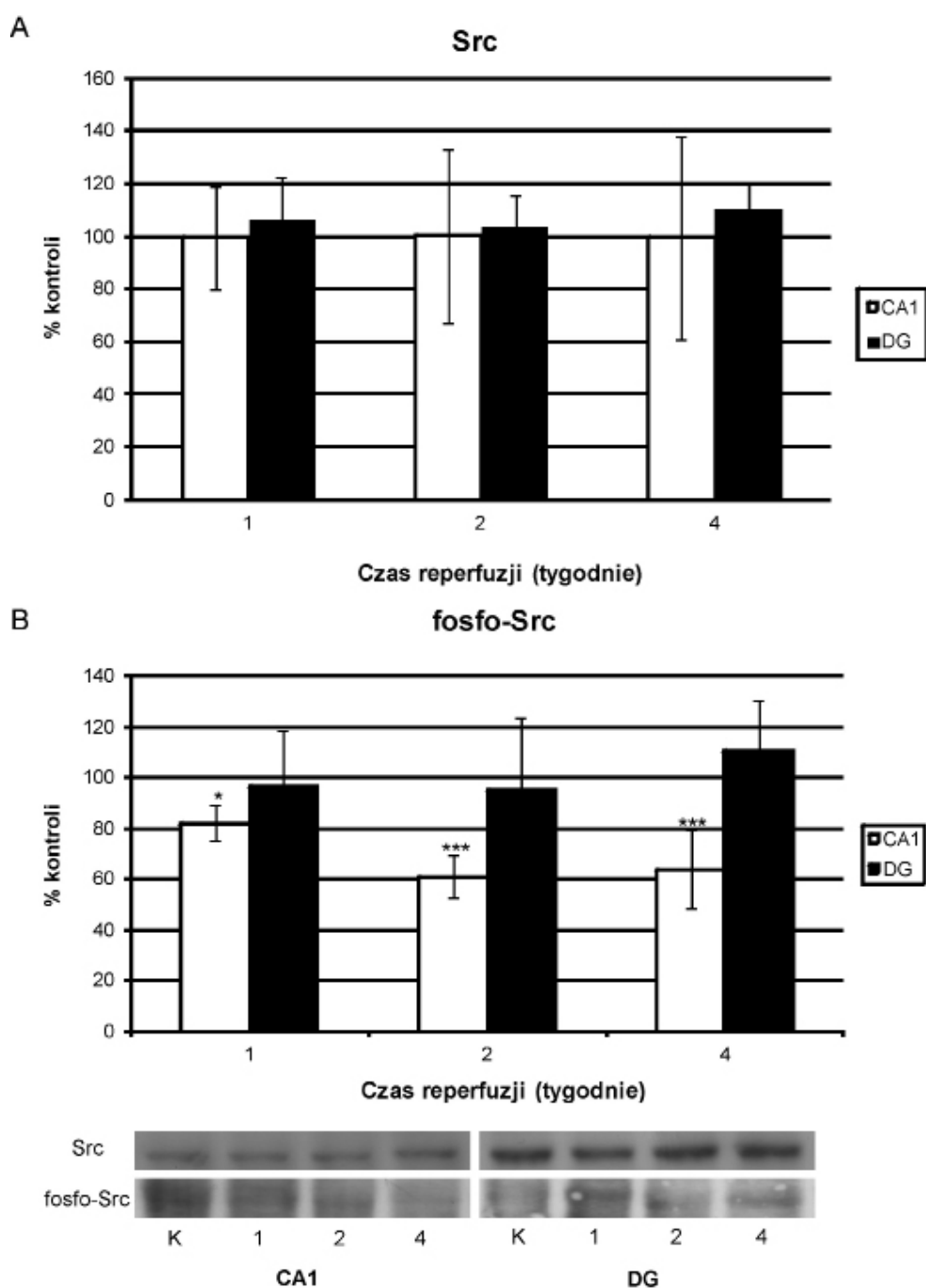
Rycina 20. Poziom białka Akt (A) i fosfo-Akt (B) w hipokampie myszkoczek mongolskiego po niedokrwieniu/rperfuzji. Wykresy przedstawiają względne poziomy kinazy Akt i jej formy ufosforylowanej na Ser 473 (w stosunku do przyjętego za 100% poziomu białka w odnośnej części hipokampa zwierzęcia kontrolnego) uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Każda wartość jest średnią (+/- SD) uzyskaną z analizy hipokampów pięciu zwierząt, przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Test ANOVA z testem post hoc Bonferroni: ** $p < 0,01$.



Rycina 21. Poziom białka ERK (A) i fosfo-ERK (B) w hipokampie myszkoczek mongolskiego po 5 min. Niedokrwieniu/reperfuzji. Wykresy przedstawiają względne poziomy kinazy ERK i jej formy ufosforylowanej na Thr202/Tyr204 (w stosunku do przyjętego za 100% poziomu białka w odnośnej części hipokampa zwierzęcia kontrolnego) uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Każda wartość jest średnią (+/- SD) uzyskaną z analizy hipokampów pięciu zwierząt, przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Test ANOVA z testem post hoc Bonferroni: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**



Rycina 22. Poziom białka JNK (A) i fosfo-JNK (B) w hipokampie myszkoczek mongolskiego po niedokrwieniu/reperfuzji. Wykresy przedstawiają względne poziomy kinazy JNK i jej formy ufosforylowanej na Thr183/Tyr185 (w stosunku do przyjętego za 100% poziomu białka w odnośnej części hipokampa zwierzęcia kontrolnego) uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Każda wartość jest średnią (+/- SD) uzyskaną z analizy hipokampów pięciu zwierząt, przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Test ANOVA z testem post hoc Bonferroni.



Rycina 23. Poziom białka Src (A) i fosfo-Src (B) w hipokampie myszokoczka mongolskiego niedokrwieniu/reperfuzji. Wykresy przedstawiają względne poziomy kinazy Src i jej formy ufosforylowanej na Tyr416 (w stosunku do przyjętego za 100% poziomu białka w odnośnej części hipokampa zwierzęcia kontrolnego) uzyskane w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Każda wartość jest średnią (+/- SD) uzyskaną z analizy hipokampów pięciu zwierząt, przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Test ANOVA z testem post hoc Bonferroni: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

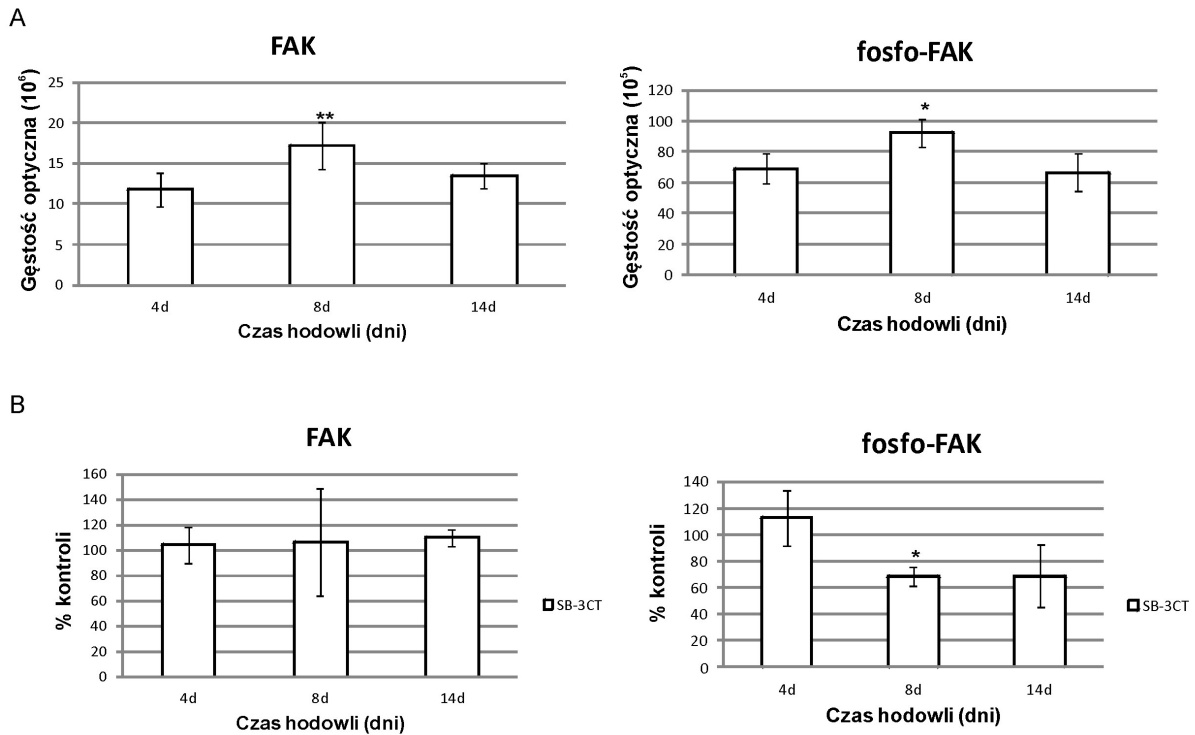
4. 6. Ekspresja i fosforylacja kinaz: FAK, PYK2, Src, ERK, JNK, oraz Akt w komórkach linii HUCB-NSC. Wpływ inhibitora metaloproteinaz – SB-3CT

Fosforylację/aktywację niereceptorowych kinaz białkowych związanych z przekaźnictwem sygnału od receptorów integrynowych oznaczono także *in vitro*. Materiałem badawczym były hodowane na fibronectynie komórki linii HUCB-NSC ulegające spontanicznej proliferacji i różnicowaniu. Hodowle prowadzono w obecności/lub bez inhibitora metaloproteinaz SB-3CT. Wyniki analizy densytometrycznej wykonanych Western blotów wskazują na odmienny charakter zmian aktywności poszczególnych kinaz w porównaniu ze zmianami obserwowanymi w hipokampie myszokoczek mongolskiego po niedokrwieniu/reperfuzji. Kinazą, której fosforylacja/aktywacja oraz ekspresja białka całkowitego ulegała zmianie, była kinaza FAK. Znaczący wzrost fosforylacji tyrozyny 397 kinazy jak i ekspresji białka natywnego (o około 40% powyżej wartości kontrolnych) widoczny jest w 8 dniu hodowli, czyli w czasie intensywnej proliferacji i różnicowania. Po 14 dniach immunoreaktywność obu form wraca do wartości oznaczonej w 4 dniu hodowli (Ryc. 24A). Immunoreaktywność białka całkowitego i ufosforylowanego (na tyrozynie 402) kinazy PYK2 pozostaje na stałym poziomie przez cały czas prowadzenia eksperymentu (4-14 dni) (Ryc. 25A).

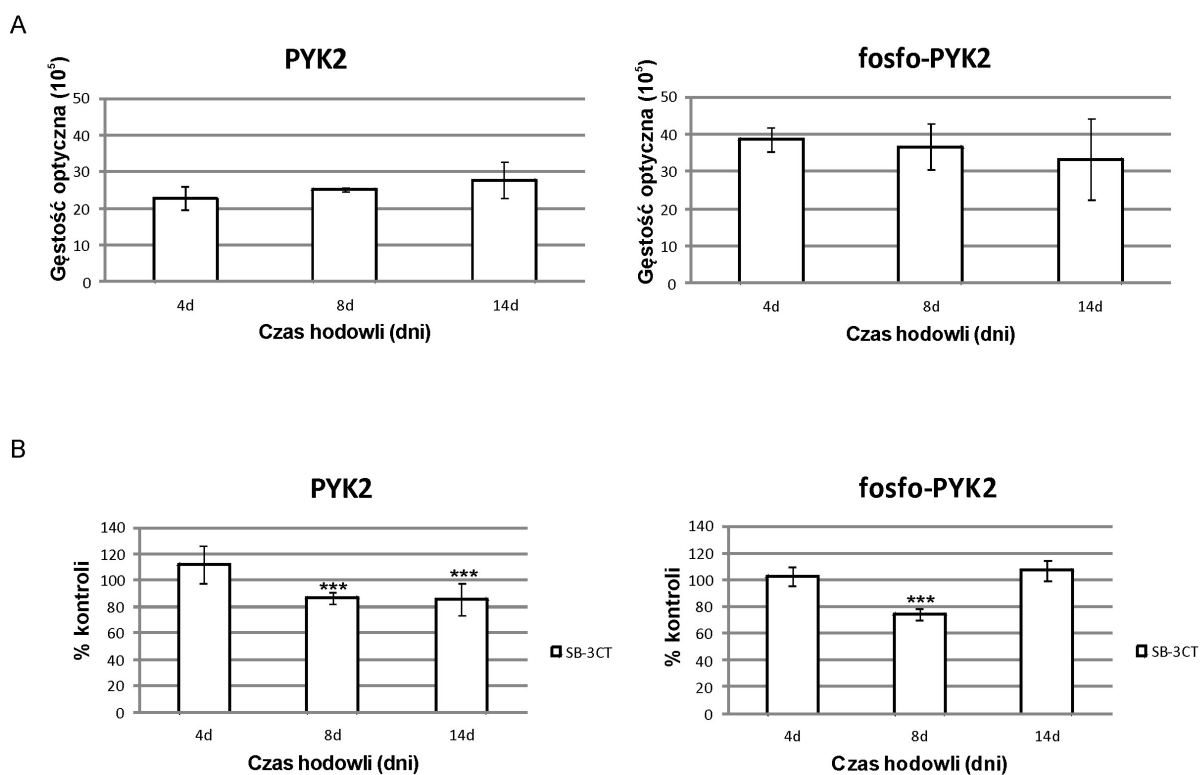
W wyniku zahamowania aktywności metaloproteinaz przez dodanie SB-3CT do medium inkubacyjnego dochodzi do obniżenia fosforylacji zarówno kinazy FAK jak i PYK2. Immunoreaktywność fosfo-FAK spada po 8 i 14 dniach hodowli do 65% w odniesieniu do właściwej kontroli (Ryc. 24B), przy zachowanej ilości białka całkowitego. Redukcję aktywności kinazy PYK2 do 75% obserwuje się po 8 dniach hodowli. Notuje się także niewielki, wynoszący około 15% spadek ekspresji białka całkowitego Ryc. 25B).

Fosforylacja/aktywacja pozostałych badanych kinaz, to jest kinazy Src, ERK, JNK i Akt (Ryc. 26, 27, 28, 29) zostaje utrzymana na tym samym poziomie niezależnie od obecności inhibitora MMPs. W obecności inhibitora obserwuje się natomiast zmianę ekspresji białek całkowitych kinaz MAP - ERK i JNK, przy różnym kierunku tych zmian. Podczas gdy immunoreaktywność białka obu form kinazy ERK (ERK 42 i ERK 44) rośnie do około 140% wartości kontrolnej w 14 dniu hodowli (Ryc. 26B), białko kinazy JNK (zarówno kinazy JNK1 (46 kDa) jak i JNK2/3 (54 kDa) ulega znaczącej redukcji (do około 45% kontroli (Rycina 27B).

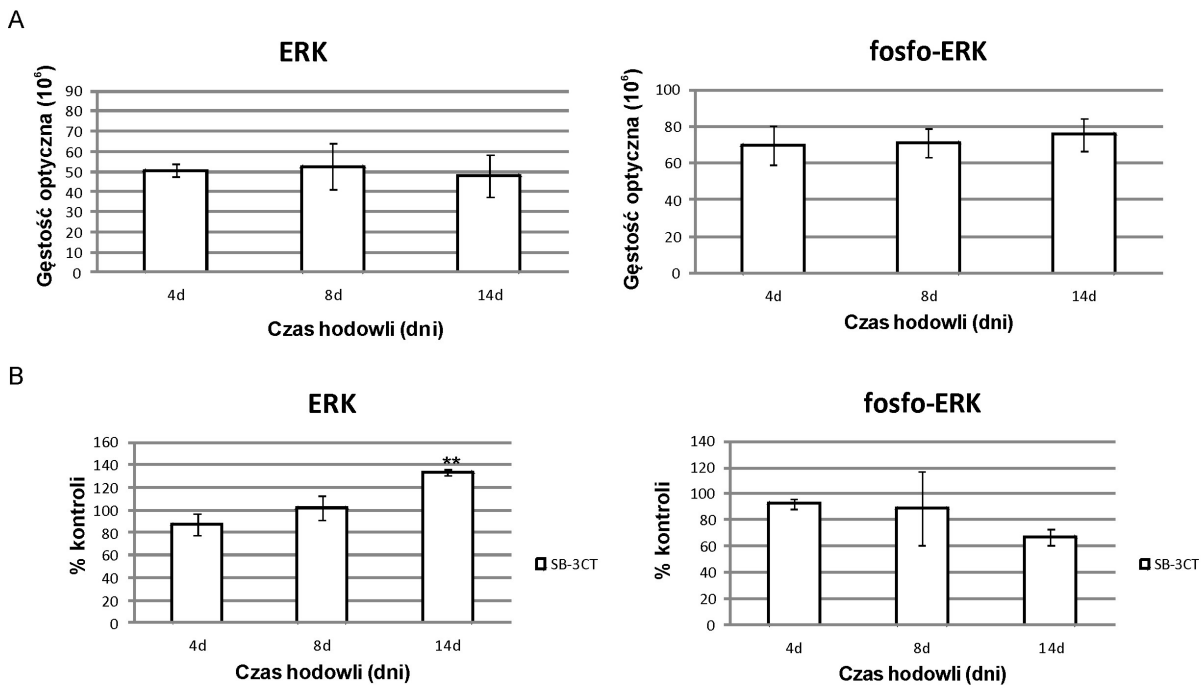
W toku prowadzonych badań jak ilustruje to ryc. 28, poziom białka kinazy Akt, oraz fosfo-Akt nie ulega zmianie zarówno w hodowli kontrolnej (bez inhibitora) jak i w obecności inhibitora metaloproteinaz (SB-3CT).



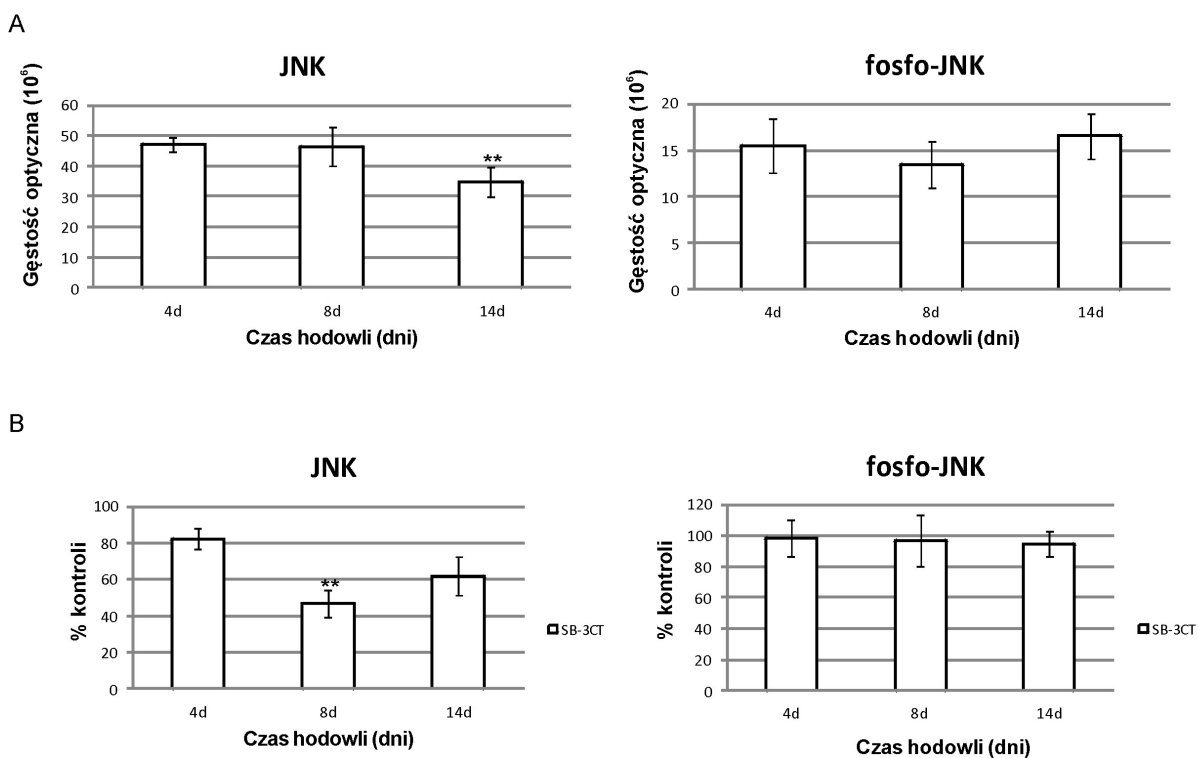
Rycina 24. Poziom białka FAK i fosfo-FAK w hodowli komórek HUCB-NSC w warunkach kontrolnych (A) oraz w obecności inhibitora – SB-3CT (B). Poziomy immunoreaktywności właściwe dla hodowli kontrolnych przedstawiono w wartościach gęstości optycznej uzyskanej w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Wpływ inhibitora SB-3CT jest przedstawiony w wartościach względnych poziomu kinazy FAK i fosfo-FAK (w stosunku do przyjętego za 100% poziomu białka w odnośnej hodowli kontrolnej). Każda wartość jest średnią (+/- SD) uzyskaną z analizy pięciu doświadczeń, przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Test ANOVA z testem post hoc Bonferroni: * $p < 0,05$ vs. 4 dni hodowli, ** $p < 0,01$ vs. 4 dni hodowli.



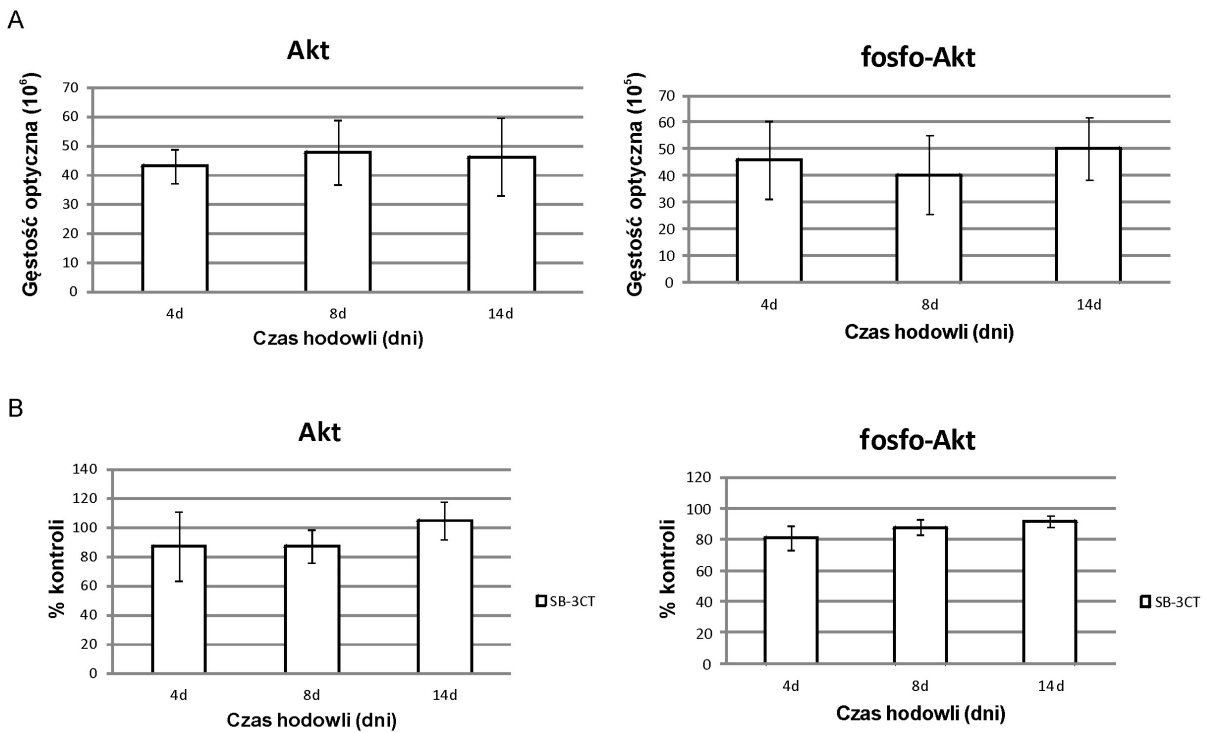
Rycina 25. Poziomy białka PYK2 i fosfo-PYK2 w hodowli komórek HUCB-NSC w warunkach kontrolnych (A) oraz w obecności inhibitora – SB-3CT (B). Poziomy immunoreaktywności właściwe dla hodowli kontrolnych przedstawiono w wartościach gęstości optycznej uzyskanej w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Wpływ inhibitora SB-3CT jest przedstawiony w wartościach względnych poziomu kinazy PYK2 i fosfo-PYK2 (w stosunku do przyjętego za 100% poziomu białka w warunkach kontrolnych). Każda wartość jest średnią (+/- SD) uzyskaną z analizy pięciu doświadczeń, przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Test ANOVA z testem post hoc Bonferroni: * $p < 0,001$ vs. 4 dni hodowli.**



Rycina 26. Poziomy białka ERK i fosfo-ERK w hodowli komórek HUCB-NSC w warunkach kontrolnych (A) oraz w obecności inhibitora – SB-3CT (B). Poziomy immunoreaktywności właściwe dla hodowli kontrolnych przedstawiono w wartościach gęstości optycznej uzyskanej w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Wpływ inhibitora SB-3CT jest przedstawiony w wartościach względnych poziomu kinazy ERK i fosfo-ERK (w stosunku do przyjętego za 100% poziomu białka w warunkach kontrolnych). Każda wartość jest średnią (+/- SD) uzyskaną z analizy pięciu doświadczeń, przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Test ANOVA z testem post hoc Bonferroni: ** $p < 0,01$ vs. 4 dni hodowli.

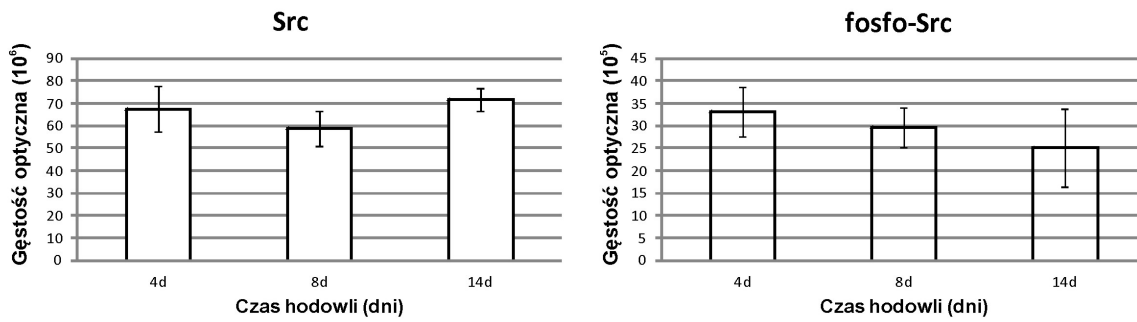


Rycina 27. Poziomy białka JNK i fosfo-JNK w hodowli komórek HUCB-NSC w warunkach kontrolnych (A) oraz w obecności inhibitora – SB-3CT (B). Poziomy immunoreaktywności właściwe dla hodowli kontrolnych przedstawiono w wartościach gęstości optycznej uzyskanej w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Wpływ inhibitora SB-3CT jest przedstawiony w wartościach względnych poziomu kinazy JNK i fosfo-JNK (w stosunku do przyjętego za 100% poziomu białka w warunkach kontrolnych). Każda wartość jest średnią (+/- SD) uzyskaną z analizy pięciu doświadczeń, przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Test ANOVA z testem post hoc Bonferroni: ** $p < 0,01$ vs. 4 dni hodowli.

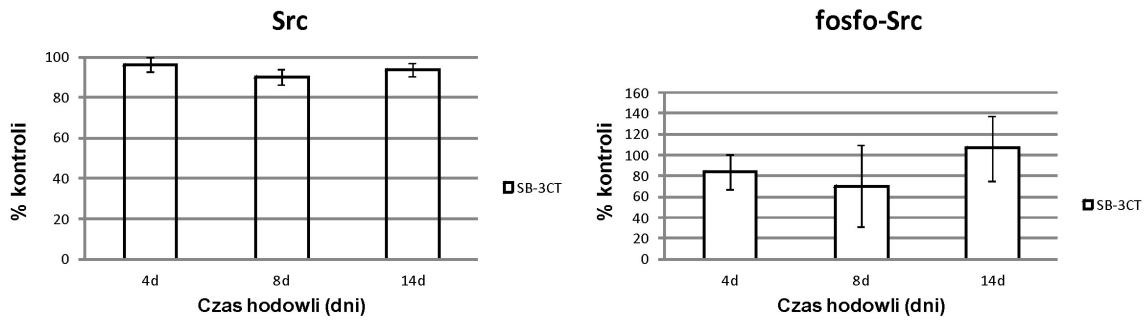


Rycina 28. Poziomy białka Akt i fosfo-Akt w hodowli komórek HUCB-NSC w warunkach kontrolnych (A) oraz w obecności inhibitora – SB-3CT (B). Poziomy immunoreaktywności właściwe dla hodowli kontrolnych przedstawiono w wartościach gęstości optycznej uzyskanej w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Wpływ inhibitora SB-3CT jest przedstawiony w wartościach względnych poziomu kinazy Akt i fosfo-Akt (w stosunku do przyjętego za 100% poziomu białka w warunkach kontrolnych). Każda wartość jest średnią (+/- SD) uzyskaną z analizy pięciu doświadczeń, przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Test ANOVA z testem post hoc Bonferroni.

A



B



Rycina 29. Poziom białka Src i fosfo-Src w hodowli komórek HUCB-NSC w warunkach kontrolnych (A) oraz w obecności inhibitora – SB-3CT (B). Poziomy immunoreaktywności właściwe dla hodowli kontrolnych przedstawiono w wartościach gęstości optycznej uzyskanej w wyniku analizy densytometrycznej Western blotów. Wpływ inhibitora SB-3CT jest przedstawiony w wartościach względnych poziomu kinazy Src i fosfo-Src (w stosunku do przyjętego za 100% poziomu białka w warunkach kontrolnych). Każda wartość jest średnią (+/- SD) uzyskaną z analizy pięciu doświadczeń, przy dwóch powtórzeniach każdego oznaczenia. Test ANOVA z testem post hoc Bonferroni.

5. DYSKUSJA

Wyniki badań eksperymentalnych zgromadzone na przestrzeni ostatnich 20 lat wskazują na aktywację procesów neurogenezy u dorosłych zwierząt w wyniku niedokrwienia mózgu. Podwyższoną aktywność proliferacyjną progenitorów neuralnych w strefach neurogennych (SGZ i SVZ), migrację w kierunku uszkodzonych struktur mózgowia, różnicowanie do odpowiednich fenotypów, a nawet znaczną poprawę funkcjonalną opisano w modelach różnych typów niedokrwienia (Arvidsson i wsp. 2002; Jin i wsp. 2003; Jin i wsp. 2004; Lindvall i Bjorklund 2004; Nakatomi i wsp. 2002; Parent i wsp. 2002; Weinandy i wsp. 2011; Zhang i wsp. 2008). Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że stymulacja neurogenezy endogennej zapewni repopulację uszkodzonych komórek nerwowych i będzie alternatywą dla metody transplantacji w terapii schorzeń neurologicznych. Należy zaznaczyć, że znacznej liczbie badaczy nie udało się potwierdzić aktywacji wszystkich etapów neurogenezy po niedokrwieniu mózgu zwierząt dorosłych. W licznych przypadkach nie obserwowano migracji nowych komórek do miejsc uszkodzenia oraz nie odnotowano poprawy funkcjonalnej (Arvidsson i wsp. 2002; Weinandy i wsp. 2011).

Faktem nie budzącym wątpliwości jest poniedokrwienna stymulacja proliferacji progenitorów neuralnych. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują na znamienne przejściowe przyśpieszenie podziałów komórkowych, po względnie krótkim okresie latencji, w neurogennej strefie zakrętu zębatego hipokampa mózgu dorosłego myszokoczka mongolskiego po niedokrwieniu przodomózgowia. Podobny czasowy wzór odpowiedzi progenitorów tej struktury obserwowano u różnych gatunków gryzoni (myszokoczków, szczurów i myszy) poddanych niedokrwieniu (Choi i wsp. 2012; Jin i wsp. 2001; Liu i wsp. 1998; Salazar-Colocho i wsp. 2008; Takagi i wsp. 1999; Tureyen i wsp. 2004). Prezentowane w publikacjach innych autorów nieznaczne przesunięcia piku proliferacji w czasie reperfuzji są prawdopodobnie związane z innym protokołem podawania BrdU po urazie lub też z zastosowaniem innego markera proliferacji. Przykładem mogą być wyniki pracy Choi i wsp. opierające się na immunoreaktywności białka Ki67, które w przeciwieństwie do BrdU znakującego komórki w fazie S cyklu komórkowego, obecne jest we wszystkich fazach aktywnych cyklu (Choi i wsp. 2012).

Dane literatury wskazują, że większość nowo wygenerowanych komórek podlega procesowi apoptozy, natomiast komórki przeżywające różnicują się do neuronów (Jin i wsp. 2001; Liu i wsp. 1998). Zgodnie z powyższym, obecność białka neurofilamentu 200 w niektórych proliferujących BrdU-pozytywnych komórkach zakrętu zębatego już po 24 godzinach od podania znacznika, świadczy o możliwości ich różnicowania w komórki o charakterze neuronów. Natomiast widoczne w neurogennej strefie SGZ nieliczne podwójnie znakowane komórki BrdU/GFAP dodatkowo są prawdopodobnie neuralnymi komórkami macierzystymi i zgodnie z poglądem Seri i wsp. mogą przekształcić się w neurony ziarniste (Seri i wsp. 2001). Z drugiej strony nie można pominąć prawdopodobnej sugestii, że komórki

te stanowią niewielką pulę proliferujących astrocytów obecnych w strefach neurogennych (Wurmser i wsp. 2004), tym bardziej, że niektórzy autorzy potwierdzają nieznaczny stopień proliferacji astrogleju w DG po niedokrwieniu globalnym (Kato i wsp. 2003; Tonchev i wsp. 2003).

Po upływie kilku tygodni od momentu niedokrwienia liczne komórki progenitorowe przemieszczają się do strefy ziarnistej DG i przekształcają w dojrzałe neurony. Zgodnie z danymi literatury neurony te różnicują się do pobudzających glutamatergicznych neuronów ziarnistych (Weinandy i wsp. 2011; Young i wsp. 2011). Obserwacja ta wpisuje się w podany przez innych autorów schemat zdarzeń wskazujący, że ekspresję białka NeuN - markera dojrzałych neuronów, poprzedza migracja neuralnych progenitorów z SGZ jedynie do sąsiedniej warstwy komórek ziarnistych (Jin i wsp. 2001; Liu i wsp. 1998; Tanaka i wsp. 2004).

W przeciwieństwie do znaczącej stymulacji endogennej neurogenezy w zakręcie zębatym, w uszkodzonej w wyniku niedokrwienia warstwie piramidowej CA1 liczba komórek wbudowujących BrdU była niewiele wyższa w porównaniu z kontrolą. W pewnej ich liczbie obecne było nawet białko NF-200 pojawiające się na wczesnym etapie rozwoju neuronu. Niestety, komórki te nie przekształcały się w neurony dojrzałe, ulegając prawdopodobnie programowanej śmierci poprzedzającej ich dalszy rozwój. Nieliczni badawcze obserwowali wprawdzie w tej strukturze dojrzałe neurony BrdU/NeuN pozytywne, ale ich liczba była znikoma (Nakatomi i wsp. 2002; Salazar-Colocho i wsp. 2008; Schmidt i Reymann 2002).

W toku prowadzonych badań nie znaleziono także, oczekiwanego przez autorkę pracy, dowodu przemieszczenia komórek progenitorowych z neurogennej strefy SGZ do uszkodzonej w wyniku niedokrwienia warstwy neuronów piramidowych. Obserwacja ta jest zgodna z przyjętym przez większość autorów poglądem, że proliferujące komórki w SGZ nie „podróżują” do miejsca uszkodzenia w CA1 (Jin i wsp. 2003; Liu i wsp. 1998; Takagi i wsp. 1999; Tanaka i wsp. 2004). Zatem spodziewana zdolność kompensacji utraconych neuronów przez endogenne progenitory w opisanych warunkach eksperymentalnych wydaje się być iluzją.

Powyższe dane pozostają w sprzeczności z publikowanymi, aczkolwiek tylko pojedynczymi pracami, wskazującymi że nowo powstałe w strefach neurogennych (SVZ lub SGZ) neurony posiadają zdolność migracji do uszkodzonej struktury CA1, po czym integrują się z istniejącą siecią neuronalną. W wyniku tych zdarzeń ma dochodzić do poprawy funkcjonalnej. Odnotowano nawet większą zdolność przyswajania informacji przestrzennych (Hou i wsp. 2008; Nakatomi i wsp. 2002; Schmidt i Reymann 2002). Zgodnie z tym faktem inhibicja neurogenezy w hipokampie nie wpływała na poprawę zaburzonych funkcji (Blais i wsp. 2011). Zaobserwowano jednak, że synapsy nowych neuronów nawet po upływie 3 miesięcy od epizodu niedokrwiennego pozostają niedojrzałe pod względem morfologicznym i mają zmienione własności elektrofizjologiczne. Niestety, autorzy przytoczonych prac nie opublikowali wyników dłuższej obserwacji zwierząt.

W świetle dotychczas zebranych informacji potencjalna naprawa uszkodzonej struktury CA1 pozostaje nadal przedmiotem kontrowersji. Rozbieżności wynikają najprawdopodobniej

z odmiennych protokołów eksperymentalnych. Przedmiotem badań cytowanej wyżej publikacji Nakatomi i wsp. (2002) był model niedokrwienia indukowanego przez okluzję 4 naczyń krwionośnych u szczurów. Według autorów źródłem progenitorów neuralnych migrujących do miejsca lezji poniedokrwiennej była okolica okołokomorowa a do znaczącej regeneracji uszkodzonego rejonu CA1 dochodziło dopiero po podaniu dokomorowym dwóch czynników wzrostu (bFGF i EGF) jednocześnie.

Analiza wyników badań otrzymanych przez autorkę wskazuje, że większość proliferujących BrdU pozytywnych komórek sektora CA1 obecna była w *stratum oriens* i *stratum radiatum*. Komórki te posiadały cechy komórek astrogleju - charakterystyczny gwiaździsty kształt i obecność białka włóknikowego GFAP.

Dotychczas nie zostały wyjaśnione mechanizmy molekularne sterujące procesem neurogenezy w SGZ, a szczególnie istotnym z punktu widzenia praktycznego przejściem z fazy spoczynkowej do proliferującej oraz zachowaniem równowagi pomiędzy przeżyciem nowych komórek a ich eliminacją. Nie ulega wątpliwości, że stymulowany niedokrwieniem rozwój progenitorów podlega kontroli przez harmonijne współdziałanie licznych czynników komórkowych oraz czynników otoczenia komórki. Można przypuszczać, że odmienne właściwości progenitorów struktur hipokampa jak i sygnały pochodzące ze środowiska mogą determinować różnice potencjału neurogenetycznego w SGZ/CA1.

Według autorki rozprawy jedną z bardziej interesujących obserwacji jest wyraźna różnica poziomu aktywności metaloproteinaz w badanych strukturach hipokampa. Stymulacji rozwoju neuralnych komórek macierzystych w zakręcie zębatym po niedokrwieniu przodomózgowia towarzyszy wyraźny wzrost aktywności MMPs. Taki czasowo-przestrzenny związek pomiędzy aktywacją metaloproteinaz a przyspieszoną proliferacją komórek macierzystych/progenitorowych i ich późniejszym różnicowaniem do dojrzałych neuronów może sugerować istnienie przyczynowego związku pomiędzy tymi procesami. Za słusznością tej sugestii przemawiają wyniki eksperymentów wykonanych na hodowli komórek linii HUCB-NSC w obecności inhibitora metaloproteinaz – SB-3CT. Obecność inhibitora redukowała stopień spontanicznej proliferacji komórek oraz ich różnicowania w kierunku neuronów. Nie można jednak wykluczyć, że zredukowana liczba niedojrzałych jak i dojrzałych neuronów (odpowiednio Tuj1 i MAP-2 pozytywnych) może także wynikać z obniżonego poziomu ich generacji i/lub ich śmierci. W tym samym eksperymencie równocześnie notowano wzrost, w porównaniu z kontrolą, liczby oligodendrocytów i astrocytów, wynikający prawdopodobnie ze wzrostu proliferacji.

Podsumowując, wyniki badań *in vivo* oraz *in vitro* zamieszczone w niniejszej rozprawie skłaniają do nowego spojrzenia na rolę MMPs, zupełnie różną od tradycyjnie przypisywanej jej szkodliwej roli we wczesnej fazie poniedokrwiennego uszkodzenia mózgu (Asahi i wsp. 2000; Gasche i wsp. 2006; Zalewska i wsp. 2002) i pozostaje w zgodzie z interesującymi wynikami pracy Barkho i wsp., popierającymi rolę endogennych MMPs w neurogenezie indukowanej udarem (Barkho i wsp. 2008).

O roli MMPs świadczy również brak wpływu na proces neurogenezy inhibitorów proteinaz serynowych i furyny. Sugerowany przez autorkę udział MMPs w procesie poniedokrwiennej neurogenezy jest zgodny z wynikami badań *in vivo* i *in vitro* wskazującymi na regulacyjną rolę enzymów w procesie migracji neuroblastów w macierzy zewnątrzkomórkowej (Jablonska i wsp. 2010; Lee i wsp. 2006; Tsukatani i wsp. 2003; Zhao i wsp. 2006) oraz podczas proliferacji i różnicowania neuralnych komórek prekursorowych po niedokrwieniu globalnym i ogniskowym mózgu gryzoni (Barkho i wsp. 2008; Lu i wsp. 2008). Z drugiej jednak strony, zachowany w obecności inhibitora metaloproteinaz pewien stopień proliferacji sugeruje, że nie jest ona zależna wyłącznie od aktywności MMPs.

W tym miejscu pojawia się pytanie, w jaki sposób wzrost aktywności MMPs przekłada się na generację nowych neuronów. W obecnym stanie mojej wiedzy nie jest możliwe precyzyjne określenie, która z licznych funkcji MMPs jest związana bezpośrednio z neurogenезą poniedokrwinną. Jeden z prawdopodobnych scenariuszy rozważa proteolityczną modulację białek regulatorowych i/lub przemodelowanie ECM (Nagase i Woessner, Jr. 1999) prowadzące między innymi do odsłonięcia ukrytych w strukturze macierzy, normalnie niedostępnych miejsc, lub uwolnienia rozpuszczalnych fragmentów macierzy (Xu i wsp. 2001) promujących migrację (Wang i wsp. 2006). Na przykład odsłonięcie miejsc umożliwiających wiązanie proteolitycznych fragmentów białek ECM - kolagenu I lub lamininy V z receptorami integrynowymi prowadzi do aktywacji „maszyny” migracji (Goldfinger i wsp. 1998; Messent i wsp. 1998). W świetle cytowanych danych logiczną wydaje się być sugestia, że obserwowaną przez autorkę migrację komórek zakrętu zębatego z SGZ do GCL ułatwia degradacja ECM przez MMPs.

Uzupełnieniem roli MMPs w migracji mogłoby być promowanie wydłużania neurytów poprzez degradację substratów hamujących wzrost, takich jak glikoproteiny związane z mieliną, siarczan proteoglikanu chondroityny, a także semaforyny i efryny, które hamują regenerację połączeń neuronalnych (Gonthier i wsp. 2009; Ould-Yahoui i wsp. 2009).

Rozważając udział MMPs w neurogenезie należy mieć na uwadze zdolność enzymów do przekształcenia uwolnionych z ECM czynników wzrostu do ich form aktywnych biologicznie, które zgodnie z wynikami badań *in vitro* oraz *in vivo* mogą być źródłem sygnałów pro-neurogenicznych (Bruno i Cuello 2006). Należy dodać, że niedokrwienie indukuje ekspresję licznych czynników wzrostowych i neurotroficznych (na przykład BDNF, bFGF, GDNF) (Kitagawa i wsp. 1999; Kokaia i wsp. 1995; Lin i wsp. 1997; Lippoldt i wsp. 2005), które mogą być odpowiedzialne za neurogenезę poniedokrwinną (Dempsey i Kalluri 2007; Kitagawa i wsp. 1999; Kokaia i wsp. 1995; Lin i wsp. 1997; Lippoldt i wsp. 2005). Niestety, jedynie nieliczne badania wskazują na udział czynników wzrostowych w aktywacji neurogenezy w modelu globalnego niedokrwienia mózgu. Oprócz omówionego wyżej wpływu bFGF i EGF (Nakatomi i wsp. 2002) opisano także stymulację różnicowania progenitorów w kierunku neuronów w DG po podaniu BDNF (Schabitz i wsp. 2007). Natomiast u myszy z deficytem FGF-2 obserwowano redukcję stopnia proliferacji (Yoshimura i wsp. 2001).

Na liście kandydatów rozważanych jako potencjalni mediatorzy stymulowanej niedokrwieniem neurogenezy znajdują się jeszcze inne czynniki wzrostowe, takie jak GDNF, EGF i VEGF (Lichtenwalner i Parent 2006), ale informacje na temat regulacji procesu neurogenezy przy ich udziale są bardzo ograniczone. Należy mieć na uwadze fakt, że większość publikowanych danych oparta jest na obserwacjach uzyskanych po egzogennym podaniu badanych czynników *in vivo* lub na wynikach badań *in vitro*. Liczne czynniki wzrostowe i neurotroficzne wiążą się ze specyficznymi receptorami i aktywują drogi sygnałowe wpływając na ekspresję specyficznych genów odpowiedzialnych za proliferację, różnicowanie i/lub migrację komórek. Co ciekawe, w szlaku przekazywania związanego z receptorami czynników wzrostu biorą udział molekuly sygnałowe stymulowane także wiązaniem białek ECM do receptorów integrzynowych. Na przykład, aktywacja kinazy MAP za pośrednictwem receptorów czynników wzrostowych lub integrzyn promuje proliferację (Ransome i Turnley 2007), podczas gdy stymulacja PI3K/Akt stymuluje różnicowanie (Otaegi i wsp. 2006). Poza tym nie wszystkie czynniki wzrostowe są stymulatorami proliferacji progenitorów neuralnych. Niektóre z nich, na przykład TGF β 1, mogą hamować podziały komórkowe (Wachs i wsp. 2006). I jakkolwiek niedokrwienie prowadzi do podwyższonego poziomu czynników wzrostowych, nie wiadomo który z nich pełni krytyczną rolę w neurogenezie.

Kolejnym interesującym wynikiem autorki rozprawy jest odkrycie obecności aktywności MMPs w jądrach neuronalnych zakrętu zębatego. Spostrzeżenie to jest zgodne z demonstrowaną aktywnością żelatynolityczną w jądrach neuronów mózgu po zatrzymaniu dopływu krwi oraz w jądrach hodowanych astrocytów (Amantea i wsp. 2008; Yang i wsp. 2010). Obecna w jądrach komórkowych aktywna metaloproteinaza może być włączona w mechanizm dzięki któremu komórki macierzyste/progenitorowe regulują program ekspresji genów. Jednak dla potwierdzenia tej hipotezy konieczne są dalsze badania.

Tym niemniej, niezależnie od mechanizmu działania żelatynaz, przestrzenna i czasowa korelacja aktywności MMPs i przyspieszonego wbudowywania BrdU do komórek strefy neurogennej przemawia za udziałem badanych enzymów w neurogenezie indukowanej niedokrwieniem.

Autorka rozprawy nie zna właściwej i jednoznacznej odpowiedzi na pytanie dlaczego nie obserwowano neurogenezy w uszkodzonej niedokrwieniem warstwie neuronów piramidowych CA1. Wśród dyskutowanych przyczyn uwzględnia się uformowanie blizny glejowej (Fawcett i Asher 1999; Nedergaard i Dirnagl 2005) oraz wysokie poziomy przynajmniej jednego inhibitora metaloproteinaz (TIMP-1) znalezione w reaktywnych astrocytach w modelu całkowitego niedokrwienia (Rivera i wsp. 2002). Konsekwencją podwyższonego poziomu inhibitora w tej strukturze może być obserwowane obniżenie aktywności MMPs. Obie odpowiedzi ułatwiają tworzenie omawianej blizny glejowej, która uniemożliwia konieczne dla procesu regeneracji przemodelowanie uszkodzonej tkanki. Komórki glejowe, do niedawna postrzegane jako komórki podporowe w mózgu, modulują środowisko zarówno przez kontakt jak i wydzielane czynniki. Z badań wielu autorów wynika, że astrocyty prezentują na swojej powierzchni uwalniane przez

siebie białka jak również cytokiny, czynniki wzrostu, neuroprzekaźniki wydzielane przez inne komórki będące w ich otoczeniu lub dostarczane z krwią i płynem mózgowo-rdzeniowym w odpowiedzi zarówno na fizjologiczne jak i patologiczne bodźce (Chen i wsp. 2005; Lie i wsp. 2005; Shetty i wsp. 2005). Czynniki te mogą zwiększać przeżywalność i regenerację neuronów lub uczestniczyć w procesie uszkodzenia komórek nerwowych. W początkowym okresie aktywowane astrocyty uwalniają czynniki, które biorą udział w mobilizacji endogennych progenitorów neuralnych (Viviani i Marinovich 2005). Reaktywny astroglej może mieć podwyższony stopień syntezy CNTF, który stymulując produkcję FGF-2 korzystnie wpływa na przeżywalność neuronów (Albrecht i wsp. 2003). Ponadto aktywne astrocyty produkują czynnik wzrostu nerwów (Oderfeld-Nowak i wsp. 1992) oraz IL-4 i IL-10 wykazujące działanie neuroprotektcyjne (Hulshof i wsp. 2002). Przedłużająca się aktywacja astrocytów może hamować neurogenezę na skutek uwolnienia cytokin prozapalnych, takich jak IL-1, IL-6, TNF α , które hamują proliferację i nasilają apoptozę nowopowstałych neuronów (Nakayama i wsp. 2003; Norenberg 2005). Zaobserwowano, że urazom OUN towarzyszy wzrost poziomu TGF β , którego źródłem były aktywowane astrocyty. Czynniki ten w znacznym stopniu hamował powstawanie neuronów u myszy (Buckwalter i wsp. 2006). Być może obserwowany w naszych doświadczeniach niski poziom proliferacji i brak dojrzałych neuronów w warstwie uszkodzonych komórek piramidowych CA1 może wynikać z ujemnego bilansu czynników promujących i hamujących neurogenezę.

Zaburzenie mikrośrodowiska mogłoby być również związane z aktywacją komórek mikrogleju i wydzielania przez nie czynników humoralnych na wczesnym etapie rozwoju uszkodzenia. Dane literatury opisują niekorzystny efekt uwalnianych cytokin pro-zapalnych na neurogenezę (Herx i Yong 2001; Stoll i wsp. 2002). Jakkolwiek wyjaśnienie udziału mikrogleju nie było objęte zakresem planowanych przez autorkę rozprawy badań, podjęła ona próby identyfikacji tych komórek stosując specyficzne markery. Niestety, żadne z komercyjnie dostępnych przeciwciał nie reagowało pozytywnie ze skrawkami hipokampa mózgu myszokoczka mongolskiego.

W przeciwieństwie do niskiej aktywności MMPs w warstwie komórek piramidowych, znaczącą aktywację żelatynolityczną obserwowano w *stratum oriens* i w *stratum radiatum*, a więc w pewnej odległości od miejsca uszkodzenia. Zgodnie z wcześniejszymi wynikami badań prowadzonych w naszym Zakładzie, zmiany indukowane niedokrwieniem obejmują najpierw rejon dendrytów neuronów piramidowych CA1 w *stratum radiatum* a następnie rozprzestrzeniają się do *stratum oriens* (Ziemka-Nalecz i wsp. 2003). W tych rejonach odpowiedzi tkanki po urazie wydają się być związane z pojawieniem się reaktywnych astrocytów i w konsekwencji z podwyższoną aktywnością MMPs, która może ułatwiać opóźnione przemodelowanie i naprawę na obwodzie ogniska uszkodzenia. Przypuszczenie to jest zgodne ze wzrostem aktywności MMPs głównie w przedziale zewnątrzkomórkowym i cytoplazmatycznym, podczas gdy w DG wyraźniejszy sygnał fluorescencyjny obecny był w jądrach komórkowych.

Jednym z istotnych elementów proteolitycznej aktywności metaloproteinaz jest zmiana

struktury macierzy zewnątrzkomórkowej i ekspozycja nowych miejsc wiązania białek ECM z receptorami powierzchni komórki. Efektem tych zdarzeń może być stymulacja lub inhibicja komórkowych szlaków przekazywania sygnału od receptorów integrynowych. Ponieważ miejscem poniedokrwiennnej neurogenezy jest wyłącznie zakręt zębaty hipokampa można było oczekiwać, że odpowiedzi białek efektorowych włączonych w przekaznictwo sygnału z ECM przebiegają według odmiennego, specyficznego dla danej struktury schematu. Należy dodać, że badania szlaku integrynowego w kontekście neurogenezy w układzie *ex vivo* nie były dotychczas podejmowane.

Według dostępnej wiedzy opartej na eksperymentach prowadzonych na komórkach nie neuronalnych (głównie fibroblastach), kluczowym białkiem wiążącym zmiany zachodzące w środowisku zewnątrzkomórkowym z odpowiedzią komórki jest kinaza kontaktów adhezyjnych, czyli kinaza FAK, aktywowana/fosforylowana wiązaniem białek ECM do integryn. Warunkiem aktywności enzymu jest fosforylacja reszty tyrozyny w pozycji 397 łańcucha polipeptydowego. Sygnał przenoszony jest następnie na dalsze etapy w kaskadzie fosforylacji określonych substratów (Parsons 2003). Liczne badania wskazują na regulacyjną rolę FAK w progresji cyklu komórkowego (Gilmore i Romer 1996; Oktay i wsp. 1999). Postulowany przez niektórych autorów wpływ kinazy FAK na proliferację i różnicowanie komórek macierzystych *in vitro* związany jest z aktywacją dwóch szlaków: szlaku kinaz aktywowanych mitogenami (MAP) oraz szlaku kinaz PI3K/Akt (Campos i wsp. 2004; Tate i wsp. 2004). Zgodnie z publikowanymi wynikami badań kinazy te regulowały program proliferacji i różnicowania progenitorów neuralnych izolowanych z mózgu szczura i embrionu myszy (Huang i wsp. 2011; Jin i wsp. 2005; Li i wsp. 1999; Weston i wsp. 2002).

Podjęte przez autorkę rozprawy próby uzyskania bezpośredniego dowodu udziału kinazy FAK w neurogenezie poniedokrwiennnej w DG nie przyniosły oczekiwanych wyników. Nie odnotowano spodziewanego związku między wzrostem poziomu fosforylacji Tyr-397 FAK a proliferacją/różnicowaniem komórek progenitorowych. Wprost przeciwnie, zaobserwowano niewielki, aczkolwiek znamienny statystycznie, spadek fosforylacji korelujący ze wzrostem aktywności metaloproteinaz. Taki czasowy związek między aktywnością metaloproteinaz i inhibicją fosforylacyjną FAK opisał Menon i wsp. w hodowli miocytów (Menon i wsp. 2006). Obniżenie aktywności kinazy FAK może prowadzić do redukcji fosforylacji jej substratów i osłabienia zależnego od kinazy szlaku przekaznictwa. Zatem dane przedstawione w rozprawie mogą poddawać w wątpliwość przyczynowy udział aktywacji kinazy FAK w neurogenezie poniedokrwiennnej. Warto tutaj zaznaczyć, że dotychczasowe próby określenia roli omawianej kinazy w komórkach nie-neuralnych przyniosły szereg kontrowersyjnych wyników. Według niektórych badaczy pozbawienie komórek kinazy FAK (FAK^{-/-}) jak i traktowanie ich RNAi FAK nie wpływa na zdolność proliferacji (Duxbury i wsp. 2003; Ilić i wsp. 1995). Z kolei inni badacze podkreślają, że warunkiem proliferacji jest obecność aktywnej kinazy FAK (Pirone i wsp. 2006).

Analizując wyniki zamieszczone w rozprawie należy wziąć pod uwagę możliwość,

że nieznaczne obniżenie fosfo-FAK zmniejsza stopień adhezji do macierzy zewnątrzkomórkowej i ułatwia migrację komórek, w tym przypadku do strefy ziarnistej DG. Założenie to pozostaje obecnie w sferze hipotez, jakkolwiek jest zgodne z opisanym w publikacjach udziałem tej kinazy w migracji wielu typów komórek nie-neuronalnych *in vitro* i *in vivo* (Ezratty i wsp. 2005; Furuta i wsp. 1995; Ilić i wsp. 1995; Mitra i wsp. 2005). Mechanizm regulacji tego procesu mimo upływu lat pozostaje nadal nieokreślony.

W toku prowadzonych badań nie znaleziono dowodów na kompensację spadku aktywności FAK przez należącą do tej samej rodziny kinazę PYK2, co zaobserwowano w komórkach nie-neuronalnych (Sieg i wsp. 1998; Ueki i wsp. 1998). Obniżenie fosforylacji Tyr 402 kinazy PYK2 we fragmencie grzbietowym hipokampa przy zachowaniu stałego poziomu kinazy FAK wskazuje, że obie kinazy mają odmienne własności funkcjonalne pomimo wysokiej homologii. Warto przy tym odnotować, że chociaż spadek ufosforylowania kinazy FAK miał miejsce w neurogenym DG a kinazy PYK2 w części grzbietowej hipokampa, to obie odpowiedzi korelują z obniżeniem aktywności ich końcowego substratu - kinazy ERK. Na tle doniesień podkreślających rolę kinazy ERK w proliferacji progenitorów neuralnych *in vitro* (Campos i wsp. 2004; Tate i wsp. 2004), redukcja jej aktywności w neurogenym zakręcie zębatym była zaskoczeniem dla autorki rozprawy. W obecnym stanie wiedzy trudno wytłumaczyć mechanizm tego zdarzenia.

Aktywność kinazy FAK może być regulowana nie tylko przez integryny, ale także przez receptory sprzężone z białkami G, receptory czynników wzrostu, lub też inne, jeszcze nie poznane mechanizmy. Zatem aktualny stan aktywacji enzymu w neurogenym zakręcie zębatym można rozpatrywać jako wypadkową osłabienia kontaktu z macierzą i/lub modulacji szlaków sygnałów zainicjowanych na przykład przez czynniki wzrostu, przyczyniając się do ich integracji (Sharma i Kumar 1998; Sieg i wsp. 2000).

Analizując wyniki badań niniejszej rozprawy należy podkreślić, że SGZ - strefa neurogenna zakrętu zębatego, stanowi jedynie niewielką część objętości badanego fragmentu brzuszego hipokampa a heterogenne populacje komórek tej struktury mogą dawać niejednoznaczne odpowiedzi. Precyzyjna detekcja zmian w SGZ nie była możliwa przy badaniu ekstraktów przygotowanych z całych fragmentów. Budzące początkowo nadzieję badania immunohistochemiczne nie zakończyły się sukcesem, ponieważ stosowane przeciwciała komercyjne okazały się być wysoce niespecyficzne.

Zgodnie z publikowanymi wynikami badań *in vitro* komórek nie-neuronalnych, bezpośrednią konsekwencją obniżenia fosforylacji Tyr-397 jest zmniejszenie zdolności do interakcji z partnerami molekularnymi i inhibicja drogi sygnałowej prowadzącej do aktywacji kinazy ERK (Huang i wsp. 2007; Igishi i wsp. 1999). Na podstawie analizy wyników prezentowanych w rozprawie nie można stwierdzić definitywnie, pomimo atrakcyjności proponowanej hipotezy, że obniżenie poziomu ufosforylowanej formy FAK pasuje do tego obrazu, ponieważ wzór odpowiedzi kinazy ERK manifestujący się obniżeniem aktywności/fosforylacji po niedokrwieniu mózgu myszokoczka mongolskiego jest podobny

w obu badanych strukturach. Kinaza ERK, podobnie jak kinaza FAK może być aktywowana w odpowiedzi na szereg bodźców działających przy udziale receptorów kinaz tyrozynowych czy wielu receptorów związanych z białkami G (Derkinderen i wsp. 1999). Zatem obniżenie aktywności kinazy ERK może być wypadkową synergistycznego lub przeciwstawnego działania różnych mechanizmów o różnym stopniu nasilenia w badanych strukturach. Być może poziom aktywności kinazy ERK w DG, aczkolwiek nieznacznie obniżony, może być wystarczający dla przebiegu procesu neurogenezy. Pomimo istniejących danych wskazujących na udział w regulacji proliferacji PI3/Akt i przeżycia neuralnych komórek macierzystych/progenitorowych w mózgu dojrzałym (Chang i wsp. 2004), nie odbiegający od kontroli poziom aktywacji/fosforylacji kinazy Akt jak i JNK w moich doświadczeniach stawia pod znakiem zapytania udział tych enzymów jako czynników krytycznych, odpowiedzialnych za stymulację neurogenezy poniedokrwienną w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego. Nie można przy tym wykluczyć trudności technicznych uniemożliwiających detekcję subtelných zmian.

Opisane badania *ex vivo* nad udziałem kinaz białkowych zostały powtórzone w modelu eksperymentalnym *in vitro* z zastosowaniem hodowli linii komórek HUCB-NSC. Odnotowany znaczący wzrost ufosforylowania Tyr 397 kinazy FAK oraz ekspresji białka kinazy w czasie intensywnej proliferacji i różnicowania komórek HUCB-NSC może wskazywać na zaangażowanie enzymu w proces spontanicznej proliferacji i różnicowania komórek w tym układzie doświadczalnym. O roli kinazy FAK świadczy także obniżenie poziomu fosforylacji w komórkach traktowanych inhibitorem metaloproteinaz – SB-3CT.

W tych samych warunkach eksperymentalnych dochodzi do redukcji dynamiki podziałów komórkowych. Inhibicja aktywności metaloproteinaz uniemożliwia prawdopodobnie konieczne dla procesu dojrzewania proteolityczne przemodelowanie substratu adhezyjnego, jakim jest fibronektyna.

Obecna w komórkach HUCB-NSC kinaza PYK2 prezentuje stały poziom przez cały czas prowadzonego eksperymentu i nie wydaje się pełnić roli w dojrzewaniu komórek HUCB-NSC, choć pojedyncze doniesienia podkreślają jej udział w proliferacji komórek mezenchymalnych (Kuwabara i wsp. 2004). Badane kinazy MAP (ERK i JNK) oraz kinaza Akt od początku do końca eksperymentu (4-14 dni) pozostawały aktywne, prezentując stały poziom fosforylacji, nie ulegając modulacji w warunkach wzrostu aktywności kinazy FAK. Powyższe dane nie są zgodne z wynikami uzyskanymi w hodowli macierzystych komórek mezenchymalnych, dokumentujących zależność aktywacji kinaz MAP od fosforylacji kinazy FAK (Mruthyunjaya i wsp. 2010). Różnice są związane prawdopodobnie ze specyficznymi odpowiedziami komórek macierzystych pochodzących z różnych źródeł.

Można zatem przypuszczać, że poziom aktywności badanych kinaz w komórkach HUCB-NSC był wystarczający dla aktywacji czynników transkrypcyjnych wpływających na spontaniczny charakter procesu proliferacji i różnicowania komórek HUCB-NSC. W świetle uzyskanych wyników kinazy MAP jak i kinaza Akt nie wydają się być przy tym efektorami sygnału integrynowego, ponieważ ich aktywność nie ulegała zmianie w obecności inhibitora

MMPs – SB-3CT. Natomiast niespodziewanym wynikiem był wzrost ekspresji kinazy ERK i obniżenie JNK w tych warunkach eksperymentalnych. Można założyć, że jest to odpowiedź niespecyficzna, jakkolwiek jej wyjaśnienie wymaga dalszych badań.

Na podstawie tych danych nie jest możliwe określenie roli aktywacji kinazy FAK i jej potencjalnych efektorów w czasie proliferacji i różnicowania. Kinaza FAK może aktywować szereg szlaków sygnałowych. Wystarczy zaznaczyć, że związanie liganda zewnątrzkomórkowego przez receptor integrynowy i aktywacja kinazy umożliwia przyłączenie około 50 białek sygnałowych i strukturalnych, które potencjalnie mogą być włączone w neurogenezę. Dodatkową trudność w określeniu roli kinazy kontaktów adhezyjnych stanowi fakt, że pośredniczy ona w dwukierunkowym przenoszeniu sygnału. Podczas gdy sygnały z zewnątrz („outside-in”) kierują zmianą organizacji cytoszkieletu i jądrową ekspresją genów, białka sygnałowe przenoszące sygnał z wnętrza komórki wpływają na budowę ECM oraz na zachowanie sąsiednich komórek („inside-out”). Nie wiemy czy i który kierunek przekazu sygnału jest uprzywilejowany w określonych warunkach doświadczalnych.

Podsumowując obserwacje poczynione w toku realizacji badań i wynikające z nich wnioski należy mieć na uwadze fakt, że liczne procesy mające swój udział w stymulacji lub inhibicji poszczególnych etapów neurogenезy mogą być stymulowane równocześnie. Mogą się też wzajemnie regulować. Konieczne jest zatem określenie ich roli i sekwencyjnej ekspresji w odniesieniu do danego modelu doświadczalnego.

Uwagi Końcowe

Wyniki przeprowadzonych przez mnie badań neurogenезy poniedokrwiennej jak i te pochodzące z eksperymentów innych badaczy nie napawają optymizmem. Większość nowych komórek ulega przedwczesnej apoptozie i nie różnicuje do dorosłych neuronów w rejonach wymagających regeneracji. Alternatywną strategią wydaje się być opracowanie metody bezpiecznej, nieinwazyjnej stymulacji endogennej, która będzie w stanie zastąpić utracone komórki w polach uszkodzenia. Poznanie molekularnej natury i mechanizmu działania tych sygnałów może mieć zasadnicze znaczenie dla dalszego zrozumienia regeneracyjnej zdolności progenitorów neuralnych w mózgu dorosłych osobników. Znaczący wzrost liczby nowych neuronów po niedokrwieniu, które integrowały się z istniejącą siecią neuronalną i prawdopodobnie uczestniczyły w przywróceniu funkcji, notowano po podaniu czynników wzrostowych – FGF-2 i IGF (Nakatomi i wsp. 2002). Można przypuszczać, że czynniki wzrostowe stymulowały rezerwy regeneracyjne uszkodzonego mózgu włącznie z pobudzeniem endogennych komórek macierzystych. Stymulację neurogenезy po eksperymentalnym udarze mózgu zaobserwowano również po podaniu nie-toksycznych, tak zwanych małych związków (np. inhibitorów deacetylazy histonu). Warto wspomnieć także wyniki pracy grupy badaczy francuskich uzyskane w pracowni kierowanej przez Lazdunskiego (Heurteaux i wsp. 2010). Badacze ci opublikowali ostatnio efektywną metodę indukcji neurogenезy *in vitro* przy pomocy

ziołowych preparatów o nazwie MLC 601 i MLC 901 (zwanymi też NeuroAid i NeuroAid1). Preparaty te podawane pacjentom zapobiegały neurologicznym zaburzeniom po-udarowym. Przytoczone dane wskazują na możliwość stymulacji endogennej neurogenezy przy udziale czynników egzogennych.

Pomimo tych zachęcających wyników, bezpośrednia stymulacja neurogenezy celem repopulacji uszkodzonej przez czynniki chorobowe tkanki nerwowej wydaje się być bardzo odległa. Aby stała się ona możliwa, konieczne jest określenie szeregu parametrów ściśle związanych z patofizjologią choroby (takich jak odpowiedni czas podania czynnika stymulującego, miejsce podania oraz dawka). Ocena skuteczności i bezpieczeństwa interwencji opartej na neurogenezie wymaga jeszcze odpowiednich narzędzi umożliwiających monitorowanie jej poszczególnych etapów *in vivo*.

Nasza aktualna wiedza oparta jest głównie na analizie statycznej, polegającej na ocenie dynamiki proliferacji komórek poprzez stopień wbudowania BrdU i określeniu fenotypu komórek BrdU-pozytywnych w oparciu o reakcję immunohistologiczną. Uzyskiwane w ten sposób dane odnoszą się jedynie do danego punktu czasowego u jednego osobnika. Rozwój technik obrazowania, jaki miał miejsce w ostatniej dekadzie, wskazał na możliwość użycia technik dostępnych w klinice takich jak rezonans magnetyczny, pozytronowa tomografia emisyjna czy obrazowanie optyczne. Należy jednak mieć na uwadze fakt, że żadna z obecnie dostępnych metod nie pozwala na specyficzną detekcję populacji neuralnych prekursorów i młodych neuronów będących wyznacznikiem dynamiki neurogenezy (Couillard-Despres i Aigner 2011).

6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Wyniki badań *ex vivo* :

- Krótkotrwałe (5 min.) całkowite niedokrwienie mózgu myszokoczka mongolskiego stymuluje proliferację, migrację i różnicowanie progenitorów neuralnych w strefie podziarnistej zakrętu zębatego (DG) hipokampa.
- Proces neurogenezy w zakręcie zębatym koreluje z aktywacją metaloproteinaz, MMP-2 i MMP-9.
- Proliferacja progenitorów neuralnych, aczkolwiek znacznie mniej intensywna aniżeli w zakręcie zębatym, ma miejsce także we wrażliwym na niedokrwienie rejonie rogu Ammona (CA1). Powstające młode neurony nie osiągają jednak stanu dojrzałości.
- Aktywność metaloproteinaz w warstwie neuronów piramidowych sektora CA1 jest niższa od kontroli. Natomiast wyraźny wzrost aktywności, związany głównie z astrocytami występuje w *stratum oriens* i *stratum radiatum*.
- W wyniku niedokrwienia/reperfuzji dochodzi do obniżenia aktywności kinazy kontaktów adhezyjnych (FAK) wyłącznie w zakręcie zębatym, a kinazy PYK2 oraz Src w fragmencie grzbietowym hipokampa. Odpowiedź kinazy ERK nie wykazuje specyficzności topograficznej i prezentuje ten sam charakter zmian w obu badanych fragmentach. Aktywność kinazy JNK i Akt pozostaje na poziomie oznaczonym dla kontroli.

Wyniki badań *in vitro*:

- Obecność inhibitora metaloproteinaz SB-3CT w czasie hodowli komórek neuralnych linii HUCB-NSC obniża stopień proliferacji i zmienia profil różnicowania promując powstawanie komórek glejowych i hamując różnicowanie do neuronów.
- W komórkach HUCB-NSC aktywność kinazy kontaktów adhezyjnych oraz ekspresja białka całkowitego rośnie w okresie intensywnej proliferacji.
- W obecności inhibitora metaloproteinaz immunoreaktywność ufosforylowanej formy kinazy FAK jak i kinazy PYK2 ulega obniżeniu.
- Aktywności kinaz: Src, MAP (ERK i JNK) oraz Akt i nie zmieniają się w sposób znaczący w czasie prowadzonej hodowli zarówno w obecności jak i bez inhibitora metaloproteinaz.

7. WNIOSKI

- Całkowite niedokrwienie mózgu myszokoczka mongolskiego stymuluje neurogenezę w strefie podziarnistej (SGZ) zakrętu zębatego hipokampa.
- Czasowo-przestrzenna korelacja procesu neurogenety i aktywności metaloproteinaz w zakręcie zębatym wskazuje na zaangażowanie tych enzymów w rozwój komórek macierzystych/progenitorowych.
- Poniedokrwienna stymulacja neurogenety endogennej nie zapewnia repopulacji uszkodzonych komórek nerwowych sektora CA1 hipokampa.
- Aktywność metaloproteinaz w strukturach CA1 - *stratum oriens i radiatum* może być związana z procesami przemodelowania tkanki.
- Na podstawie uzyskanych wyników nie można jednoznacznie określić udziału badanych kinaz białkowych - przekaźników sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej, w neurogenecie poniedokrwiennej w hipokampie mózgu myszokoczka mongolskiego.

Piśmiennictwo

1. Abrous D.N., Koehl M., Le M.M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 2005;85(2):523-569.
2. Albrecht P.J., Murtie J.C., Ness J.K., Redwine J.M., Enterline J.R., Armstrong R.C., Levison S.W. Astrocytes produce CNTF during the remyelination phase of viral-induced spinal cord demyelination to stimulate FGF-2 production. *Neurobiol Dis* 2003;13(2):89-101.
3. Ali S.A., Pappas I.S., Parnavelas J.G. Collagen type IV promotes the differentiation of neuronal progenitors and inhibits astroglial differentiation in cortical cell cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 1998;110(1):31-38.
4. Allen E. The cessation of the mitosis in the central nervous system of the albino rat. *J Comp Neurol* 1912;22:547-568.
5. Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 1962;135:1127-1128.
6. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 1969;137(4):433-457.
7. Altman J. i Das G.D. Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature* 1967;214(5093):1098-1101.
8. Alvarez-Buylla A. i Garcia-Verdugo J.M. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 2002;22(3):629-634.
9. Alvarez-Buylla A. i Lim D.A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 2004;41(5):683-686.
10. Amantea D., Corasaniti M.T., Mercuri N.B., Bernardi G., Bagetta G. Brain regional and cellular localization of gelatinase activity in rat that have undergone transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience* 2008;152(1):8-17.
11. Androutsellis-Theotokis A., Leker R.R., Soldner F., Hoepfner D.J., Ravin R., Poser S.W., Rueger M.A., Bae S.K., Kittappa R., McKay R.D. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature* 2006;442(7104):823-826.
12. Anthony D.C., Ferguson B., Matyzak M.K., Miller K.M., Esiri M.M., Perry V.H. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997;23(5):406-415.
13. Aoto H., Sasaki H., Ishino M., Sasaki T. Nuclear translocation of cell adhesion kinase beta/proline-rich tyrosine kinase 2. *Cell Struct Funct* 2002;27(1):47-61.
14. Arias-Carrion O., Olivares-Bunuelos T., Drucker-Colin R. [Neurogenesis in the adult brain]. *Rev Neurol* 2007;44(9):541-550.
15. Arvidsson A., Collin T., Kirik D., Kokaia Z., Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002;8(9):963-970.
16. Asahi M., Asahi K., Jung J.C., del Zoppo G.J., Fini M.E., Lo E.H. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20(12):1681-1689.

17. Astier A., Avraham H., Manie S.N., Groopman J., Canty T., Avraham S., Freedman A.S. The related adhesion focal tyrosine kinase is tyrosine-phosphorylated after beta1-integrin stimulation in B cells and binds to p130cas. *J Biol Chem* 1997;272(1):228-232.
18. Avraham S., London R., Fu Y., Ota S., Hiregowdara D., Li J., Jiang S., Pasztor L.M., White R.A., Groopman J.E., . Identification and characterization of a novel related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) from megakaryocytes and brain. *J Biol Chem* 1995;270(46):27742-27751.
19. Balu D.T. i Lucki I. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev* 2009;33(3):232-252.
20. Barkho B.Z., Munoz A.E., Li X., Li L., Cunningham L.A., Zhao X. Endogenous matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-9 promote the differentiation and migration of adult neural progenitor cells in response to chemokines. *Stem Cells* 2008;26(12):3139-3149.
21. Beggs H.E., Schahin-Reed D., Zang K., Goebbels S., Nave K.A., Gorski J., Jones K.R., Sretavan D., Reichardt L.F. FAK deficiency in cells contributing to the basal lamina results in cortical abnormalities resembling congenital muscular dystrophies. *Neuron* 2003;40(3):501-514.
22. Berardi N., Pizzorusso T., Maffei L. Extracellular matrix and visual cortical plasticity: freeing the synapse. *Neuron* 2004;44(6):905-908.
23. Biebl M., Cooper C.M., Winkler J., Kuhn H.G. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 2000;291(1):17-20.
24. Bjorklund M. i Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2005;1755(1):37-69.
25. Blaiss C.A., Yu T.S., Zhang G., Chen J., Dimchev G., Parada L.F., Powell C.M., Kernie S.G. Temporally specified genetic ablation of neurogenesis impairs cognitive recovery after traumatic brain injury. *J Neurosci* 2011;31(13):4906-4916.
26. Breunig J.J., Silbereis J., Vaccarino F.M., Sestan N., Rakic P. Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(51):20558-20563.
27. Bruno M.A. i Cuello A.C. Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(17):6735-6740.
28. Buckwalter M.S., Coleman B.S., Buttini M., Barbour R., Schenk D., Games D., Seubert P., Wyss-Coray T. Increased T cell recruitment to the CNS after amyloid beta 1-42 immunization in Alzheimer's mice overproducing transforming growth factor-beta 1. *J Neurosci* 2006;26(44):11437-11441.
29. Buzanska L., Jurga M., Stachowiak E.K., Stachowiak M.K., Domanska-Janik K. Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells Dev* 2006;15(3):391-406.
30. Buzanska L., Ruiz A., Zychowicz M., Rauscher H., Ceriotti L., Rossi F., Colpo P., Domanska-Janik K., Coecke S. Patterned growth and differentiation of human cord blood-derived neural stem cells on bio-functionalized surfaces. *Acta Neurobiol Exp*

(Wars) 2009;69(1):24-36.

31. Campos L.S., Leone D.P., Relvas J.B., Brakebusch C., Fassler R., Suter U., French-Constant C. Beta1 integrins activate a MAPK signalling pathway in neural stem cells that contributes to their maintenance. *Development* 2004;131(14):3433-3444.
32. Candelario-Jalil E., Yang Y., Rosenberg G.A. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience* 2009;158(3):983-994.
33. Canete S.R., Gui Y.H., Linask K.K., Muschel R.J. MMP-9 (gelatinase B) mRNA is expressed during mouse neurogenesis and may be associated with vascularization. *Brain Res Dev Brain Res* 1995;88(1):37-52.
34. Canete-Soler R., Gui Y.H., Linask K.K., Muschel R.J. Developmental expression of MMP-9 (gelatinase B) mRNA in mouse embryos. *Dev Dyn* 1995;204(1):30-40.
35. Carleton A., Petreanu L.T., Lansford R., Alvarez-Buylla A., Lledo P.M. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 2003;6(5):507-518.
36. Carragher N.O., Frame M.C. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol* 2004;14(5):241-249.
37. Celio M.R., Spreafico R., De B.S., Vitellaro-Zuccarello L. Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci* 1998;21(12):510-515.
38. Chang M.Y., Park C.H., Son H., Lee Y.S., Lee S.H. Developmental stage-dependent self-regulation of embryonic cortical precursor cell survival and differentiation by leukemia inhibitory factor. *Cell Death Differ* 2004;11(9):985-996.
39. Chen H.C., Appeddu P.A., Isoda H., Guan J.L. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1996;271(42):26329-26334.
40. Chen N., Hudson J.E., Walczak P., Misiuta I., Garbuzova-Davis S., Jiang L., Sanchez-Ramos J., Sanberg P.R., Zigova T., Willing A.E. Human umbilical cord blood progenitors: the potential of these hematopoietic cells to become neural. *Stem Cells* 2005;23(10):1560-1570.
41. Choi J.H., Yoo K.Y., Lee C.H., Park J.H., Yan B.C., Kwon S.H., Seo J.Y., Cho J.H., Hwang I.K., Won M.H. Comparison of Neurogenesis in the Dentate Gyrus Between the Adult and Aged Gerbil Following Transient Global Cerebral Ischemia. *Neurochem Res* 2012;
42. Clark A.W., Krekoski C.A., Bou S.S., Chapman K.R., Edwards D.R. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett* 1997;238(1-2):53-56.
43. Colucci-D'Amato L., Bonavita V., di P.U. The end of the central dogma of neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS. *Neurol Sci* 2006;27(4):266-270.
44. Conover J.C., Doetsch F., Garcia-Verdugo J.M., Gale N.W., Yancopoulos G.D., Alvarez-Buylla A. Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci* 2000;3(11):1091-1097.
45. Cooke M.J., Zahir T., Phillips S.R., Shah D.S., Athey D., Lakey J.H., Shoichet M.S., Przyborski S.A. Neural differentiation regulated by biomimetic surfaces presenting motifs of extracellular matrix proteins. *J Biomed Mater Res A* 2010;93(3):824-832.

46. Corsi J.M., Rouer E., Girault J.A., Enslen H. Organization and post-transcriptional processing of focal adhesion kinase gene. *BMC Genomics* 2006;7:198-
47. Couillard-Despres S. i Aigner L. In vivo imaging of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2011;33(6):1037-1044.
48. Cuadrado E., Rosell A., Borrell-Pages M., Garcia-Bonilla L., Hernandez-Guillamon M., Ortega-Aznar A., Montaner J. Matrix metalloproteinase-13 is activated and is found in the nucleus of neural cells after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29(2):398-410.
49. Cunningham L.A., Wetzel M., Rosenberg G.A. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia* 2005;50(4):329-339.
50. Cuzner M.L., Gveric D., Strand C., Loughlin A.J., Paemen L., Opendakker G., Newcombe J. The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55(12):1194-1204.
51. D'Abaco G.M. i Kaye A.H. Integrins: molecular determinants of glioma invasion. *J Clin Neurosci* 2007;14(11):1041-1048.
52. Dempsey R.J. i Kalluri H.S. Ischemia-induced neurogenesis: role of growth factors. *Neurosurg Clin N Am* 2007;18(1):183-90.
53. Derkinderen P., Enslen H., Girault J.A. The ERK/MAP-kinases cascade in the nervous system. *Neuroreport* 1999;10(5):R24-R34.
54. Doetsch F. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13(5):543-550.
55. Doetsch F., Caille I., Lim D.A., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999;97(6):703-716.
56. Duong L.T. i Rodan G.A. PYK2 is an adhesion kinase in macrophages, localized in podosomes and activated by beta(2)-integrin ligation. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000;47(3):174-188.
57. Dupuy S.T. i Houser C.R. Developmental changes in GABA neurons of the rat dentate gyrus: an in situ hybridization and birthdating study. *J Comp Neurol* 1997;389(3):402-418.
58. Duxbury M.S., Ito H., Benoit E., Zinner M.J., Ashley S.W., Whang E.E. RNA interference targeting focal adhesion kinase enhances pancreatic adenocarcinoma gemcitabine chemosensitivity. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311(3):786-792.
59. Emsley J.G., Mitchell B.D., Kempermann G., Macklis J.D. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* 2005;75(5):321-341.
60. Eriksson P.S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D.A., Gage F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998;4(11):1313-1317.
61. Ethell I.M. i Ethell D.W. Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *J Neurosci Res* 2007;85(13):2813-2823.

62. Ezratty E.J., Partridge M.A., Gundersen G.G. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol* 2005;7(6):581-590.
63. Fager N. i Jaworski D.M. Differential spatial distribution and temporal regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase mRNA expression during rat central nervous system development. *Mech Dev* 2000;98(1-2):105-109.
64. Fagerholm S.C., Hilden T.J., Gahmberg C.G. P marks the spot: site-specific integrin phosphorylation regulates molecular interactions. *Trends Biochem Sci* 2004;29(9):504-512.
65. Fan H. i Guan J.L. Compensatory function of Pyk2 protein in the promotion of focal adhesion kinase (FAK)-null mammary cancer stem cell tumorigenicity and metastatic activity. *J Biol Chem* 2011;286(21):18573-18582.
66. Fanjul-Fernandez M., Folgueras A.R., Cabrera S., Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803(1):3-19.
67. Fawcett J.W. i Asher R.A. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 1999;49(6):377-391.
68. Forsyth P.A., Wong H., Laing T.D., Rewcastle N.B., Morris D.G., Muzik H., Leco K.J., Johnston R.N., Brasher P.M., Sutherland G., Edwards D.R. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer* 1999;79(11-12):1828-1835.
69. Fuchs E. i Segre J.A. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000;100(1):143-155.
70. Furuta Y., Ilic D., Kanazawa S., Takeda N., Yamamoto T., Aizawa S. Mesodermal defect in late phase of gastrulation by a targeted mutation of focal adhesion kinase, FAK. *Oncogene* 1995;11(10):1989-1995.
71. Gage F.H. Stem cells of the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 1998;8(5):671-676.
72. Gage F.H. Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* 2002;22(3):612-613.
73. Galtrey C.M. i Fawcett J.W. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev* 2007;54(1):1-18.
74. Garcia A.D., Doan N.B., Imura T., Bush T.G., Sofroniew M.V. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 2004;7(11):1233-1241.
75. Gasche Y., Soccia P.M., Kanemitsu M., Copin J.C. Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system with a special emphasis on ischemic brain. *Front Biosci* 2006;11:1289-1301.
76. Gijbels K., Masure S., Carton H., Opdenakker G. Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *J Neuroimmunol* 1992;41(1):29-34.
77. Gilmore A.P. i Romer L.H. Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) signaling in focal adhesions decreases cell motility and proliferation. *Mol Biol Cell* 1996;7(8):1209-1224.

78. Goldfinger L.E., Stack M.S., Jones J.C. Processing of laminin-5 and its functional consequences: role of plasmin and tissue-type plasminogen activator. *J Cell Biol* 1998;141(1):255-265.
79. Gonthier B., Koncina E., Satkauskas S., Perraut M., Roussel G., Aunis D., Kapfhammer J.P., Bagnard D. A PKC-dependent recruitment of MMP-2 controls semaphorin-3A growth-promoting effect in cortical dendrites. *PLoS One* 2009;4(4):e5099-
80. Gould E., Tanapat P., Hastings N.B., Shors T.J. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn Sci* 1999;3(5):186-192.
81. Graus-Porta D., Blaess S., Senften M., Littlewood-Evans A., Damsky C., Huang Z., Orban P., Klein R., Schittny J.C., Muller U. Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* 2001;31(3):367-379.
82. Gross C.G. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 2000;1(1):67-73.
83. Grote H.E. i Hannan A.J. Regulators of adult neurogenesis in the healthy and diseased brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34(5-6):533-545.
84. Hayashita-Kinoh H., Kinoh H., Okada A., Komori K., Itoh Y., Chiba T., Kajita M., Yana I., Seiki M. Membrane-type 5 matrix metalloproteinase is expressed in differentiated neurons and regulates axonal growth. *Cell Growth Differ* 2001;12(11):573-580.
85. Herx L.M. i Yong V.W. Interleukin-1 beta is required for the early evolution of reactive astrogliosis following CNS lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60(10):961-971.
86. Heurteaux C., Gandin C., Borsotto M., Widmann C., Brau F., Lhuillier M., Onteniente B., Lazdunski M. Neuroprotective and neuroproliferative activities of NeuroAid (MLC601, MLC901), a Chinese medicine, in vitro and in vivo. *Neuropharmacology* 2010;58(7):987-1001.
87. Hitchcock P.F., Lindsey Myhr K.J., Easter S.S., Jr., Mangione-Smith R., Jones D.D. Local regeneration in the retina of the goldfish. *J Neurobiol* 1992;23(2):187-203.
88. Holmberg J., Armulik A., Senti K.A., Edoff K., Spalding K., Momma S., Cassidy R., Flanagan J.G., Frisen J. Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes Dev* 2005;19(4):462-471.
89. Hou S.W., Wang Y.Q., Xu M., Shen D.H., Wang J.J., Huang F., Yu Z., Sun F.Y. Functional integration of newly generated neurons into striatum after cerebral ischemia in the adult rat brain. *Stroke* 2008;39(10):2837-2844.
90. Huang D., Khoe M., Befekadu M., Chung S., Takata Y., Ilic D., Bryer-Ash M. Focal adhesion kinase mediates cell survival via NF-kappaB and ERK signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292(4):C1339-C1352.
91. Huang Y.S., Cheng C.Y., Chueh S.H., Hueng D.Y., Huang Y.F., Chu C.M., Wu S.T., Tai M.C., Liang C.M., Liao M.H., Chen C.C., Shen L.H., Ma K.H. Involvement of SHP2 in focal adhesion, migration and differentiation of neural stem cells. *Brain Dev* 2011;
92. Hulshof S., Montagne L., De Groot C.J., Van d., V. Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions. *Glia* 2002;38(1):24-35.
93. Hynes R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110(6):673-687.

94. Igishi T., Fukuhara S., Patel V., Katz B.Z., Yamada K.M., Gutkind J.S. Divergent signaling pathways link focal adhesion kinase to mitogen-activated protein kinase cascades. Evidence for a role of paxillin in c-Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J Biol Chem* 1999;274(43):30738-30746.
95. Ihrie R.A. i Alvarez-Buylla A. Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. *Cell Tissue Res* 2008;331(1):179-191.
96. Ilić D., Kanazawa S., Takeda N., Sobue K., Nakatsuji N., Nomura S., Fujimoto J., Okada M., Yamamoto T. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 1995;377(6549):539-544.
97. Imayoshi I., Sakamoto M., Ohtsuka T., Takao K., Miyakawa T., Yamaguchi M., Mori K., Ikeda T., Itohara S., Kageyama R. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 2008;11(10):1153-1161.
98. Jablonska A., Wojcik L., Zalewska T., Lukomska B. Analysis of neurogenesis in the rat subventricular zone and hippocampus after focal brain ischemia followed by transplantation of neural stem cells derived from human umbilical cord blood (HUCB-NSC). 2010;
99. Jin K., Mao X.O., Del Rio G.G., Jin L., Greenberg D.A. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor stimulates cell proliferation in cerebral cortical cultures through phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci Res* 2005;81(4):497-505.
100. Jin K., Minami M., Lan J.Q., Mao X.O., Bateur S., Simon R.P., Greenberg D.A. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(8):4710-4715.
101. Jin K., Peel A.L., Mao X.O., Xie L., Cottrell B.A., Henshall D.C., Greenberg D.A. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(1):343-347.
102. Jin K., Sun Y., Xie L., Peel A., Mao X.O., Bateur S., Greenberg D.A. Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci* 2003;24(1):171-189.
103. Jin K., Zhu Y., Sun Y., Mao X.O., Xie L., Greenberg D.A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(18):11946-11950.
104. Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L., Risling M., Lendahl U., Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999;96(1):25-34.
105. Johns P.R. i Easter S.S., Jr. Growth of the adult goldfish eye. II. Increase in retinal cell number. *J Comp Neurol* 1977;176(3):331-341.
106. Jordan J.D., Ma D.K., Ming G.L., Song H. Cellular niches for endogenous neural stem cells in the adult brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2007;6(5):336-341.
107. Kaczmarek L., Lapinska-Dzwonek J., Szymczak S. Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *EMBO J* 2002;21(24):6643-6648.
108. Kalluri H.S. i Dempsey R.J. Growth factors, stem cells, and stroke. *Neurosurg Focus*

2008;24(3-4):E14-

109. Kam M., Curtis M.A., McGlashan S.R., Connor B., Nannmark U., Faull R.L. The cellular composition and morphological organization of the rostral migratory stream in the adult human brain. *J Chem Neuroanat* 2009;37(3):196-205.
110. Kaplan M.S. i Hinds J.W. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 1977;197(4308):1092-1094.
111. Kato H., Takahashi A., Itoyama Y. Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Bull* 2003;60(3):215-221.
112. Kawai T., Takagi N., Mochizuki N., Besshoh S., Sakanishi K., Nakahara M., Takeo S. Inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase attenuates cellular proliferation and differentiation to mature neurons in the hippocampal dentate gyrus after transient forebrain ischemia in the adult rat. *Neuroscience* 2006;141(3):1209-1216.
113. Kempermann G., Jessberger S., Steiner B., Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 2004;27(8):447-452.
114. Kempermann G., Kuhn H.G., Gage F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997;386(6624):493-495.
115. Kiel M.J. i Morrison S.J. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 2008;8(4):290-301.
116. Kim Y.S., Kim S.S., Cho J.J., Choi D.H., Hwang O., Shin D.H., Chun H.S., Beal M.F., Joh T.H. Matrix metalloproteinase-3: a novel signaling proteinase from apoptotic neuronal cells that activates microglia. *J Neurosci* 2005;25(14):3701-3711.
117. Kitagawa H., Sasaki C., Zhang W.R., Sakai K., Shiro Y., Warita H., Mitsumoto Y., Mori T., Abe K. Induction of glial cell line-derived neurotrophic factor receptor proteins in cerebral cortex and striatum after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 1999;834(1-2):190-195.
118. Kokaia Z., Zhao Q., Kokaia M., Elmer E., Metsis M., Smith M.L., Siesjo B.K., Lindvall O. Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Exp Neurol* 1995;136(1):73-88.
119. Kornack D.R. i Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(8):4752-4757.
120. Kuhn H.G., Dickinson-Anson H., Gage F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996;16(6):2027-2033.
121. Kuwabara K., Nakaoka T., Sato K., Nishishita T., Sasaki T., Yamashita N. Differential regulation of cell migration and proliferation through proline-rich tyrosine kinase 2 in endothelial cells. *Endocrinology* 2004;145(7):3324-3330.
122. Lagace D.C., Whitman M.C., Noonan M.A., Ables J.L., DeCarolis N.A., Arguello A.A., Donovan M.H., Fischer S.J., Farnbauch L.A., Beech R.D., DiLeone R.J., Greer C.A., Mandyam C.D., Eisch A.J. Dynamic contribution of nestin-expressing stem cells to adult neurogenesis. *J Neurosci* 2007;27(46):12623-12629.

123. Lee S.R., Kim H.Y., Rogowska J., Zhao B.Q., Bhide P., Parent J.M., Lo E.H. Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke. *J Neurosci* 2006;26(13):3491-3495.
124. Letourneau P.C., Condic M.L., Snow D.M. Interactions of developing neurons with the extracellular matrix. *J Neurosci* 1994;14(3 Pt 1):915-928.
125. Li L. i Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:605-631.
126. Li X., Dy R.C., Cance W.G., Graves L.M., Earp H.S. Interactions between two cytoskeleton-associated tyrosine kinases: calcium-dependent tyrosine kinase and focal adhesion tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1999;274(13):8917-8924.
127. Lichtenwalner R.J. i Parent J.M. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26(1):1-20.
128. Lichtinghagen R., Seifert T., Kracke A., Marckmann S., Wurster U., Heidenreich F. Expression of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in mononuclear blood cells of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1999;99(1):19-26.
129. Lie D.C., Colamarino S.A., Song H.J., Desire L., Mira H., Consiglio A., Lein E.S., Jessberger S., Lansford H., Dearie A.R., Gage F.H. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 2005;437(7063):1370-1375.
130. Lie D.C., Song H., Colamarino S.A., Ming G.L., Gage F.H. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:399-421.
131. Lim D.A., Tramontin A.D., Trevejo J.M., Herrera D.G., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 2000;28(3):713-726.
132. Lim Y., Han I., Jeon J., Park H., Bahk Y.Y., Oh E.S. Phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861 is crucial for Ras transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* 2004;279(28):29060-29065.
133. Lin T.N., Te J., Lee M., Sun G.Y., Hsu C.Y. Induction of basic fibroblast growth factor (bFGF) expression following focal cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;49(1-2):255-265.
134. Lindvall O. i Bjorklund A. Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx* 2004;1(4):382-393.
135. Lippoldt A., Reichel A., Moenning U. Progress in the identification of stroke-related genes: emerging new possibilities to develop concepts in stroke therapy. *CNS Drugs* 2005;19(10):821-832.
136. Liu J., Solway K., Messing R.O., Sharp F.R. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 1998;18(19):7768-7778.
137. Lledo P.M. i Gheusi G. Olfactory processing in a changing brain. *Neuroreport* 2003;14(13):1655-1663.
138. Lopez-Garcia C., Molowny A., Martinez-Guijarro F.J., Blasco-Ibanez J.M., Luis de la Iglesia JA, Bernabeu A., Garcia-Verdugo J.M. Lesion and regeneration in the medial cerebral cortex of lizards. *Histol Histopathol* 1992;7(4):725-746.

139. Lorenzl S., Albers D.S., Relkin N., Ngyuen T., Hilgenberg S.L., Chirichigno J., Cudkowicz M.E., Beal M.F. Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2003;43(3):191-196.
140. Lu L., Tonchev A.B., Kaplamadzhiev D.B., Boneva N.B., Mori Y., Sahara S., Ma D., Nakaya M.A., Kikuchi M., Yamashima T. Expression of matrix metalloproteinases in the neurogenic niche of the adult monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus* 2008;18(10):1074-1084.
141. Luo J. The role of matrix metalloproteinases in the morphogenesis of the cerebellar cortex. *Cerebellum* 2005;4(4):239-245.
142. Ma D.K., Ming G.L., Song H. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 2005;15(5):514-520.
143. Ma W., Tavakoli T., Derby E., Serebryakova Y., Rao M.S., Mattson M.P. Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Dev Biol* 2008;8:90-
144. Mannello F. i Medda V. Nuclear localization of Matrix metalloproteinases. *Prog Histochem Cytochem* 2012;
145. Marchetti G., Escuin S., van der Flier A., De A.A., Hynes R.O., Georges-Labouesse E. Integrin alpha5beta1 is necessary for regulation of radial migration of cortical neurons during mouse brain development. *Eur J Neurosci* 2010;31(3):399-409.
146. Matsumoto J., Morioka M., Hasegawa Y., Kawano T., Yoshinaga Y., Maeda T., Yano S., Kai Y., Fukunaga K., Kuratsu J. Sodium orthovanadate enhances proliferation of progenitor cells in the adult rat subventricular zone after focal cerebral ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;318(3):982-991.
147. Menn B., Garcia-Verdugo J.M., Yaschine C., Gonzalez-Perez O., Rowitch D., Alvarez-Buylla A. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 2006;26(30):7907-7918.
148. Menon B., Singh M., Ross R.S., Johnson J.N., Singh K. beta-Adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult cardiac myocytes involves MMP-2-mediated disruption of beta1 integrin signaling and mitochondrial pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290(1):C254-C261.
149. Messent A.J., Tuckwell D.S., Knauper V., Humphries M.J., Murphy G., Gavrilovic J. Effects of collagenase-cleavage of type I collagen on alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. *J Cell Sci* 1998;111 (Pt 8):1127-1135.
150. Mitra S.K., Hanson D.A., Schlaepfer D.D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(1):56-68.
151. Mobley A.K. i McCarty J.H. beta8 integrin is essential for neuroblast migration in the rostral migratory stream. *Glia* 2011;59(11):1579-1587.
152. Morrison C.J., Butler G.S., Rodriguez D., Overall C.M. Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21(5):645-653.
153. Mott J.D. i Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(5):558-564.
154. Mruthyunjaya S., Manchanda R., Godbole R., Pujari R., Shiras A., Shastry P. Laminin-1 induces neurite outgrowth in human mesenchymal stem cells in serum/differentiation

- factors-free conditions through activation of FAK-MEK/ERK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391(1):43-48.
155. Nagase H. i Woessner J.F., Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274(31):21491-21494.
 156. Nakada M., Kita D., Futami K., Yamashita J., Fujimoto N., Sato H., Okada Y. Roles of membrane type 1 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in invasion and dissemination of human malignant glioma. *J Neurosurg* 2001;94(3):464-473.
 157. Nakatomi H., Kuriu T., Okabe S., Yamamoto S., Hatano O., Kawahara N., Tamura A., Kirino T., Nakafuku M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002;110(4):429-441.
 158. Nakayama T., Momoki-Soga T., Inoue N. Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons. *Neurosci Res* 2003;46(2):241-249.
 159. Naor D., Sionov R.V., Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997;71:241-319.
 160. Nedergaard M. i Dirnagl U. Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia* 2005;50(4):281-286.
 161. Norenberg. The reactive astrocyte. The role of glia in neurotoxicity. CRC Press Boca Raton 2005;73-92.
 162. Nottebohm F. Why are some neurons replaced in adult brain? *J Neurosci* 2002;22(3):624-628.
 163. Novak U. i Kaye A.H. Extracellular matrix and the brain: components and function. *J Clin Neurosci* 2000;7(4):280-290.
 164. O'Connor S.M., Stenger D.A., Shaffer K.M., Ma W. Survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in three-dimensional agarose and collagen gel matrices. *Neurosci Lett* 2001;304(3):189-193.
 165. Oderfeld-Nowak B., Bacia A., Gradkowska M., Fusco M., Vantini G., Leon A., Aloe L. In vivo activated brain astrocytes may produce and secrete nerve growth factor-like molecules. *Neurochem Int* 1992;21(3):455-461.
 166. Oh L.Y., Larsen P.H., Krekoski C.A., Edwards D.R., Donovan F., Werb Z., Yong V.W. Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes. *J Neurosci* 1999;19(19):8464-8475.
 167. Oktay M., Wary K.K., Dans M., Birge R.B., Giancotti F.G. Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. *J Cell Biol* 1999;145(7):1461-1469.
 168. Otaegi G., Yusta-Boyo M.J., Vergano-Vera E., Mendez-Gomez H.R., Carrera A.C., Abad J.L., Gonzalez M., de la Rosa E.J., Vicario-Abejon C., de P.F. Modulation of the PI 3-kinase-Akt signalling pathway by IGF-I and PTEN regulates the differentiation of neural stem/precursor cells. *J Cell Sci* 2006;119(Pt 13):2739-2748.
 169. Ould-Yahoui A., Tremblay E., Sbai O., Ferhat L., Bernard A., Charrat E., Gueye Y., Lim N.H., Brew K., Risso J.J., Dive V., Khrestchatisky M., Rivera S. A new role for TIMP-1 in modulating neurite outgrowth and morphology of cortical neurons. *PLoS*

One 2009;4(12):e8289-

170. Palmer T.D., Markakis E.A., Willhoite A.R., Safar F., Gage F.H. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 1999;19(19):8487-8497.
171. Palmer T.D., Ray J., Gage F.H. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 1995;6(5):474-486.
172. Palmer T.D., Willhoite A.R., Gage F.H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 2000;425(4):479-494.
173. Parent J.M. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neuroscientist* 2003;9(4):261-272.
174. Parent J.M., Vexler Z.S., Gong C., Derugin N., Ferriero D.M. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 2002;52(6):802-813.
175. Parsons J.T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 8):1409-1416.
176. Peress N., Perillo E., Zucker S. Localization of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in Alzheimer's disease and normal brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54(1):16-22.
177. Petreanu L. i Alvarez-Buylla A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 2002;22(14):6106-6113.
178. Pirone D.M., Liu W.F., Ruiz S.A., Gao L., Raghavan S., Lemmon C.A., Romer L.H., Chen C.S. An inhibitory role for FAK in regulating proliferation: a link between limited adhesion and RhoA-ROCK signaling. *J Cell Biol* 2006;174(2):277-288.
179. Planas A.M., Sole S., Justicia C. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 2001;8(5):834-846.
180. Pollak D.D., Monje F.J., Zuckerman L., Denny C.A., Drew M.R., Kandel E.R. An animal model of a behavioral intervention for depression. *Neuron* 2008;60(1):149-161.
181. Ra H.J. i Parks W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* 2007;26(8):587-596.
182. Ramirez-Castillejo C., Sanchez-Sanchez F., Andreu-Agullo C., Ferron S.R., Aroca-Aguilar J.D., Sanchez P., Mira H., Escribano J., Farinas I. Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* 2006;9(3):331-339.
183. Ramon y Cajal. *Estudios sobre la degeneracion y regeeracion del sistema nervioso*. 1913;
184. Ransome M.I. i Turnley A.M. Systemically delivered Erythropoietin transiently enhances adult hippocampal neurogenesis. *J Neurochem* 2007;102(6):1953-1965.
185. Rao M.S. i Civin C.I. Translational research: toward better characterization of human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2005;23(10):1453-
186. Rauch U. Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(16):2031-2045.
187. Reynolds B.A. i Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the

- adult mammalian central nervous system. *Science* 1992;255(5052):1707-1710.
188. Richards L.J., Kilpatrick T.J., Bartlett P.F. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(18):8591-8595.
 189. Rivera S., Ogier C., Jourquin J., Timsit S., Szklarczyk A.W., Miller K., Gearing A.J., Kaczmarek L., Khrestchatisky M. Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur J Neurosci* 2002;15(1):19-32.
 190. Rivera S., Tremblay E., Timsit S., Canals O., Ben-Ari Y., Khrestchatisky M. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) is differentially induced in neurons and astrocytes after seizures: evidence for developmental, immediate early gene, and lesion response. *J Neurosci* 1997;17(11):4223-4235.
 191. Rochefort C., Gheusi G., Vincent J.D., Lledo P.M. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci* 2002;22(7):2679-2689.
 192. Roeb E., Schleinkofer K., Kernebeck T., Potsch S., Jansen B., Behrmann I., Matern S., Grotzinger J. The matrix metalloproteinase 9 (mmp-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist. *J Biol Chem* 2002;277(52):50326-50332.
 193. Rosenberg G.A., Estrada E.Y., Dencoff J.E. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 1998;29(10):2189-2195.
 194. Salazar-Colocho P., Lanciego J.L., Del R.J., Frechilla D. Ischemia induces cell proliferation and neurogenesis in the gerbil hippocampus in response to neuronal death. *Neurosci Res* 2008;61(1):27-37.
 195. Santarelli L., Saxe M., Gross C., Surget A., Battaglia F., Dulawa S., Weisstaub N., Lee J., Duman R., Arancio O., Belzung C., Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 2003;301(5634):805-809.
 196. Sawamoto K., Wichterle H., Gonzalez-Perez O., Cholfin J.A., Yamada M., Spassky N., Murcia N.S., Garcia-Verdugo J.M., Marin O., Rubenstein J.L., Tessier-Lavigne M., Okano H., Alvarez-Buylla A. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 2006;311(5761):629-632.
 197. Sbai O., Ould-Yahoui A., Ferhat L., Gueye Y., Bernard A., Charrat E., Mehanna A., Risso J.J., Chauvin J.P., Fenouillet E., Rivera S., Khrestchatisky M. Differential vesicular distribution and trafficking of MMP-2, MMP-9, and their inhibitors in astrocytes. *Glia* 2010;58(3):344-366.
 198. Schabitz W.R., Steigleder T., Cooper-Kuhn C.M., Schwab S., Sommer C., Schneider A., Kuhn H.G. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke* 2007;38(7):2165-2172.
 199. Schlaepfer D.D. i Hunter T. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol* 1998;8(4):151-157.
 200. Schmidt W. i Reymann K.G. Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 2002;334(3):153-156.

201. Schulz R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:211-242.
202. Sela-Passwell N., Rosenblum G., Shoham T., Sagi I. Structural and functional bases for allosteric control of MMP activities: can it pave the path for selective inhibition? *Biochim Biophys Acta* 2010;1803(1):29-38.
203. Seri B., Garcia-Verdugo J.M., Collado-Morente L., McEwen B.S., Alvarez-Buylla A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 2004;478(4):359-378.
204. Seri B., Garcia-Verdugo J.M., McEwen B.S., Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 2001;21(18):7153-7160.
205. Sharma B.K. i Kumar K. Role of proinflammatory cytokines in cerebral ischemia: a review. *Metab Brain Dis* 1998;13(1):1-8.
206. Sharp F.R., Liu J., Bernabeu R. Neurogenesis following brain ischemia. *Brain Res Dev Brain Res* 2002;134(1-2):23-30.
207. Shen Q., Goderie S.K., Jin L., Karanth N., Sun Y., Abramova N., Vincent P., Pumiglia K., Temple S. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 2004;304(5675):1338-1340.
208. Shetty A.K., Hattiangady B., Shetty G.A. Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes. *Glia* 2005;51(3):173-186.
209. Shioda N., Han F., Morioka M., Fukunaga K. Bis(1-oxy-2-pyridinethiolato) oxovanadium(IV) enhances neurogenesis via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and extracellular signal regulated kinase activation in the hippocampal subgranular zone after mouse focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 2008;155(3):876-887.
210. Shors T.J., Miesegaes G., Beylin A., Zhao M., Rydel T., Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 2001;410(6826):372-376.
211. Sieg D.J., Hauck C.R., Ilic D., Klingbeil C.K., Schaefer E., Damsky C.H., Schlaepfer D.D. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2000;2(5):249-256.
212. Sieg D.J., Ilic D., Jones K.C., Damsky C.H., Hunter T., Schlaepfer D.D. Pyk2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but Pyk2 does not fully function to enhance FAK- cell migration. *EMBO J* 1998;17(20):5933-5947.
213. Song H., Stevens C.F., Gage F.H. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 2002a;417(6884):39-44.
214. Song H.J., Stevens C.F., Gage F.H. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci* 2002b;5(5):438-445.
215. Sternlicht M.D. i Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
216. Stoll G., Jander S., Schroeter M. Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv Exp Med Biol* 2002;513:87-113.

217. Storms S.D., Kim A.C., Tran B.H., Cole G.J., Murray B.A. NCAM-mediated adhesion of transfected cells to agrin. *Cell Adhes Commun* 1996;3(6):497-509.
218. Strongin A.Y., Collier I., Bannikov G., Marmer B.L., Grant G.A., Goldberg G.I. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 1995;270(10):5331-5338.
219. Szymczak P., Wojcik-Stanaszek L., Sypecka J., Sokolowska A., Zalewska T. Effect of matrix metalloproteinases inhibition on the proliferation and differentiation of HUCB-NSCs cultured in the presence of adhesive substrates. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2010;70(4):325-336.
220. Takagi Y., Nozaki K., Takahashi J., Yodoi J., Ishikawa M., Hashimoto N. Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. *Brain Res* 1999;831(1-2):283-287.
221. Tanaka R., Yamashiro K., Mochizuki H., Cho N., Onodera M., Mizuno Y., Urabe T. Neurogenesis after transient global ischemia in the adult hippocampus visualized by improved retroviral vector. *Stroke* 2004;35(6):1454-1459.
222. Tanapat P., Hastings N.B., Reeves A.J., Gould E. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 1999;19(14):5792-5801.
223. Tate M.C., Garcia A.J., Keselowsky B.G., Schumm M.A., Archer D.R., LaPlaca M.C. Specific beta1 integrins mediate adhesion, migration, and differentiation of neural progenitors derived from the embryonic striatum. *Mol Cell Neurosci* 2004;27(1):22-31.
224. Tonchev A.B., Yamashima T., Zhao L., Okano H.J., Okano H. Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci* 2003;23(2):292-301.
225. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 1992;24:145-149.
226. Tsukatani T., Fillmore H.L., Hamilton H.R., Holbrook E.H., Costanzo R.M. Matrix metalloproteinase expression in the olfactory epithelium. *Neuroreport* 2003;14(8):1135-1140.
227. Tureyen K., Vemuganti R., Sailor K.A., Bowen K.K., Dempsey R.J. Transient focal cerebral ischemia-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the adult mouse. *J Neurosurg* 2004;101(5):799-805.
228. Ueki K., Mimura T., Nakamoto T., Sasaki T., Aizawa S., Hirai H., Yano S., Naruse T., Nojima Y. Integrin-mediated signal transduction in cells lacking focal adhesion kinase p125FAK. *FEBS Lett* 1998;432(3):197-201.
229. Vaillant C., Didier-Bazes M., Hutter A., Belin M.F., Thomasset N. Spatiotemporal expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum. *J Neurosci* 1999;19(12):4994-5004.
230. Vaillant C., Meissirel C., Mutin M., Belin M.F., Lund L.R., Thomasset N. MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum. *Mol Cell Neurosci* 2003;24(2):395-408.

231. van Nimwegen M.J. i van de Water B. Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2007;73(5):597-609.
232. van Praag, Schinder A.F., Christie B.R., Toni N., Palmer T.D., Gage F.H. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 2002;415(6875):1030-1034.
233. Viviani i Marinovich. Cytokines in Neuronal-Glial Interaction. In the role of glia in neurotoxicity. CRC Press 2005;125-140.
234. Vu T.H. i Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000;14(17):2123-2133.
235. Wachs F.P., Winner B., Couillard-Despres S., Schiller T., Aigner R., Winkler J., Bogdahn U., Aigner L. Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65(4):358-370.
236. Wang L., Zhang Z.G., Zhang R.L., Gregg S.R., Hozeska-Solgot A., LeTourneau Y., Wang Y., Chopp M. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. *J Neurosci* 2006;26(22):5996-6003.
237. Weinandy F., Ninkovic J., Gotz M. Restrictions in time and space--new insights into generation of specific neuronal subtypes in the adult mammalian brain. *Eur J Neurosci* 2011;33(6):1045-1054.
238. Weis S.M., Lim S.T., Lutu-Fuga K.M., Barnes L.A., Chen X.L., Gothert J.R., Shen T.L., Guan J.L., Schlaepfer D.D., Cheresch D.A. Compensatory role for Pyk2 during angiogenesis in adult mice lacking endothelial cell FAK. *J Cell Biol* 2008;181(1):43-50.
239. Weston C.R., Lambright D.G., Davis R.J. Signal transduction. MAP kinase signaling specificity. *Science* 2002;296(5577):2345-2347.
240. Winner B., Cooper-Kuhn C.M., Aigner R., Winkler J., Kuhn H.G. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 2002;16(9):1681-1689.
241. Wojcik L., Sawicka A., Rivera S., Zalewska T. Neurogenesis in gerbil hippocampus following brain ischemia: focus on the involvement of metalloproteinases. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2009;69(1):52-61.
242. Wojcik-Stanaszek L., Sypecka J., Szymczak P., Ziemka-Nalecz M., Khrestchatisky M., Rivera S., Zalewska T. The potential role of metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global forebrain ischemia. *PLoS One* 2011;6(7):e22465-
243. Wright J.W. i Harding J.W. The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. *Prog Neurobiol* 2004;72(4):263-293.
244. Wright J.W., Kramar E.A., Meighan S.E., Harding J.W. Extracellular matrix molecules, long-term potentiation, memory consolidation and the brain angiotensin system. *Peptides* 2002;23(1):221-246.
245. Wurmser A.E., Palmer T.D., Gage F.H. Neuroscience. Cellular interactions in the stem cell niche. *Science* 2004;304(5675):1253-1255.
246. Xiong W.C., Macklem M., Parsons J.T. Expression and characterization of splice variants of PYK2, a focal adhesion kinase-related protein. *J Cell Sci* 1998;111 (Pt 14):1981-1991.

247. Xu P., Wang Y., Piao Y., Bai S., Xiao Z., Jia Y., Luo S., Zhuang L. Effects of matrix proteins on the expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during the first trimester. *Biol Reprod* 2001;65(1):240-246.
248. Yamamoto S., Nagao M., Sugimori M., Kosako H., Nakatomi H., Yamamoto N., Takebayashi H., Nabeshima Y., Kitamura T., Weinmaster G., Nakamura K., Nakafuku M. Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 2001;21(24):9814-9823.
249. Yang Y., Candelario-Jalil E., Thompson J.F., Cuadrado E., Estrada E.Y., Rosell A., Montaner J., Rosenberg G.A. Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 2010;112(1):134-149.
250. Yong V.W., Krekoski C.A., Forsyth P.A., Bell R., Edwards D.R. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci* 1998;21(2):75-80.
251. Yong V.W., Power C., Forsyth P., Edwards D.R. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(7):502-511.
252. Yoshimura S., Takagi Y., Harada J., Teramoto T., Thomas S.S., Waeber C., Bakowska J.C., Breakefield X.O., Moskowitz M.A. FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(10):5874-5879.
253. Young S.Z., Taylor M.M., Bordey A. Neurotransmitters couple brain activity to subventricular zone neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2011;33(6):1123-1132.
254. Zalewska T., Ziemka-Nalecz M., Sarnowska A., Domanska-Janik K. Involvement of MMPs in delayed neuronal death after global ischemia. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2002;62(2):53-61.
255. Zalewska T., Ziemka-Nalecz M., Sarnowska A., Domanska-Janik K. Transient forebrain ischemia modulates signal transduction from extracellular matrix in gerbil hippocampus. *Brain Res* 2003;977(1):62-69.
256. Zhang R.L., Zhang Z.G., Chopp M. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. *Neuropharmacology* 2008;55(3):345-352.
257. Zhao J., Zheng C., Guan J. Pyk2 and FAK differentially regulate progression of the cell cycle. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 17):3063-3072.
258. Zhao Y., Nakagawa T., Itoh S., Inamori K., Isaji T., Kariya Y., Kondo A., Miyoshi E., Miyazaki K., Kawasaki N., Taniguchi N., Gu J. N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on alpha3beta1 integrin-mediated cell migration. *J Biol Chem* 2006;281(43):32122-32130.
259. Ziemka-Nalecz M., Zalewska T., Zajac H., Domanska-Janik K. Decrease of PKC precedes other cellular signs of calpain activation in area CA1 of the hippocampus after transient cerebral ischemia. *Neurochem Int* 2003;42(3):205-214.













